

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO
OBRIGATÓRIO

ÁREA: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
Técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao estudo de vírus de interesse
médico veterinário

Aluna: Jéssica Cristhine Gallego
Orientadora: Elisabete Takiuchi

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado, como parte das exigências
para a conclusão do Curso de Graduação
em Medicina Veterinária da Universidade
Federal do Paraná

PALOTINA – PR
Dezembro de 2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

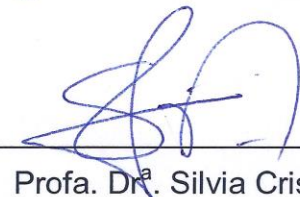
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Relatório Final de Estágio Supervisionado
Área de Estágio: Medicina Veterinária Preventiva – Diagnóstico Molecular
Acadêmica: Jéssica Cristhine Gallego
Orientador de Estágio USP: Prof. Dr. Fábio Gregori
Orientador de Estágio UEL: Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri
Supervisor de Estágio: Prof^a. Dr^a. Elisabete Takiuchi

O PRESENTE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO FOI
APRESENTADO E APROVADO PELA SEGUINTE BANCA
EXAMINADORA:



M.V. Rúbia Macedo



Profa. Dr^a. Silvia Cristina Osaki



Profa. Dr^a. Elisabete Takiuchi
Supervisora

Palotina, 16 de dezembro de 2013

*“Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte disso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”*
[Fernando Pessoa]

AGRADECIMENTOS

Antes de todas as pessoas que estimularam meu desenvolvimento, preciso agradecer aos meus pais Neiva e Silvio, que mesmo em uma sociedade desigual e moralista, conseguiram que eu estudasse em bons colégios, me incentivaram à leitura, a pensar com imaginação e ao enriquecimento pelo conhecimento.

Agradeço à minha irmã Raissa, minha melhor amiga de infância, e que diariamente me lembra da nossa ínfima condição humana e da nossa gigantesca capacidade espiritual. Agradeço também à Nicole, minha irmã mais nova, pela paciência que eu adoro estimular de uma forma divertida e irritante. E por me fazer entender a importância do exemplo.

Minhas amigas: Carlye, Claudia, Gisele, Juliana, Lilian e Mariana, obrigada por rirem comigo, e me fazer rir quando eu precisava, minha vida seria bem mais triste sem boas amizades como a que vocês me proporcionam.

Minha família palotinese: Juliana e Patrícia, obrigada pelos bons dias, e pela preocupação. Renata e Ziza obrigada pelas conversas e piadas. Maria, obrigada pelos abraços.

Agradeço às minhas irmãs científicas: Andressa, pelo seu jeito acolhedor e pela risada gostosa; Janaína pelas conversas e por me viciar em abobrinha; Rúbia, por me ouvir e por trazer alegria ao laboratório. E ao nosso único irmão científico Douglas, pelo seu jeito estabonado e cheio de sotaque, é impossível lembrar de você sem sorrir.

À Nadir, Acelino e Juliano, vocês foram maravilhosos para mim, espero um dia retribuir todos os almoços em família, as risadas e histórias.

Fernanda, obrigada pela companhia nos fins de tarde de bicicleta, e pelas divagações construtivas.

À Maristela, minha psicóloga, pelas manhãs de sábado, e por ajudar a entender meus devaneios.

Agradeço aos meus professores da UFPR, pelos quais eu mantenho admiração, e espero ser condizente pessoal e profissionalmente nos aprendizados dentro e fora das salas de aula.

Agradeço especialmente à Bete, minha mãe científica, desde a primeira vez que a vi eu sabia que ia trabalhar com você, e que hoje é minha orientadora e amiga.

À todos que durante meu período de estágio, obrigada por ensinarem algo novo à estagiária, em especial à Carol (codorna), Aline, Sueli, Fábio, Luís, Elis, Ana e Brígida. À Izabel e ao Marcos pelas boas conversas. À Sandra, pela chave de casa, aguentar minha bagunça, e pelo apoio incondicional. E a todas as pessoas que conheci e me acrescentaram.

Agradeço às coincidências do destino que nesses cinco anos uniu e mudou a vida de uma turma de estudantes, e permitiu entre muitas provas, trabalhos e festas, conhecer pessoas que eu jamais esquecerei.

Agradeço aos meus familiares pelo apoio, longe ou perto.

À todas as pessoas que durante esses cinco anos de graduação participaram da minha vida, e que pela lei natural dos encontros deixaram e receberam um tanto.

Ao Scott pela amizade canina que faz falta até hoje, ao Fred obrigada e desculpas (queria ter sido melhor para você), e à Moa minha companheira de relatório, obrigada por trazer felicidade e bagunça à nossa família.

Ao céu de Palotina de todas as manhãs e fins de tarde.

E por último, obrigada a Deus, que permitiu que esse ser pensante desenvolvesse habilidades, e por me capacitar para fazer o bem.

FOLHA DE IDENTIFICAÇÃO

LOCAL DE ESTÁGIO 1: Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

São Paulo – São Paulo

Carga horária cumprida: 280 horas.

Período de realização do estágio: 12/08/2013 a 27/09/2013

Orientador: Prof. Dr. Fábio Gregori

Supervisora: Prof.^a Dr.^a Elisabete Takiuchi

LOCAL DE ESTÁGIO 2: Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

Londrina – Paraná

Carga horária cumprida: 320 horas

Período de realização do estágio: 30/09/2013 a 22/11/2013

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alice Fernandes Alfieri

Supervisora: Prof.^a Dr.^a Elisabete Takiuchi

RESUMO

O presente trabalho de conclusão de curso relata as atividades técnicas desenvolvidas do período de 12 de agosto a 27 de setembro de 2013 na Universidade de São Paulo – USP, e do período de 30 de setembro a 22 de novembro de 2013 na Universidade Estadual de Londrina – UEL, dentro da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório da Universidade Federal do Paraná. As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia – LABMAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Gregori. E no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL, sob a orientação da Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri. De uma maneira geral, descreve a estrutura e funcionamento de ambos os laboratórios, com ênfase nas seguintes atividades: recebimento do material biológico, métodos de extração de ácido nucléico viral, detecção molecular por PCR e suas variações, sequenciamento genômico, clonagem, caracterização molecular e o uso de ferramentas de bioinformática para estudos de epidemiologia molecular.

Palavras-chave: diagnóstico; biologia molecular; virologia; medicina veterinária preventiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A: Fachada do prédio da FMVZ da USP; B: Entrada principal do Departamento Medicina Veterinária Preventiva.....	3
Figura 2 - Planta baixa LABMAS.....	4
Figura 3 - Anexo I do LABMAS - Biologia Molecular Aplicada A: Entrada do Anexo I LABMAS; B: Recepção e escritório; C: Sala cultivo celular	5
Figura 4 - Sala de Processamento do LABMAS.....	6
Figura 5 - Subdivisões do Anexo I do LABMAS A: Sala Mix-PCR; B: Sala de distribuição das amostras	6
Figura 6 - Subdivisões do Anexo I do LABMAS A: Setor Sequenciamento; B: Almoxarifado.....	7
Figura 7 - Anexo II do LABMAS - Sorologia A, B,C: Sala Sorologia; D: Placa informativa do setor de clonagem; E: Entrada do setor clonagem; F: Parte interna restrita à técnica clonagem.....	8
Figura 8 - Anexo III do LABMAS – Sala Eletroforese A: Bancada e equipamentos para eletroforese; B: Sistema de fotodocumentação de géis.....	8
Figura 9 - Cabine de fluxo laminar do Anexo I – LABMAS.....	10
Figura 10 - Fluxograma de análise amostras/dados LABMAS. (Setas pontilhadas: processo opcional; cores correspondem ao setor que ocorre o processo).....	11
Figura 11 – Prédio do Laboratório de Virologia Animal – UEL	12
Figura 12 - Planta baixa do piso inferior do Laboratório de Virologia Animal - UEL	13
Figura 13 - Área suja do Laboratório de Virologia Animal	14
Figura 14 - Setores de processamento do Laboratório de Virologia Animal. A: Sala de cultivo de células; B: Sala de Soroneutralização; C: Sala Macerado; D: Sala Purificação; E: Sala Clonagem	15
Figura 15 - Sala Lavagem e Esterilização do Laboratório de Virologia Animal	15
Figura 16 - Sala de Eletroforese do Laboratório de Virologia Animal.....	16
Figura 17 - Planta baixa do piso superior do Laboratório de Virologia Animal	16
Figura 18 - Área limpa do Laboratório.....	16

Figura 19 - Setores de Biologia Molecular do Laboratório de Virologia Animal. A: Sala de Mix; B,C: Sala de célula mãe; D: Sala de Nested; E,F: Sala de distribuição de amostras; G: Sala de sequenciamento	17
Figura 20 - Setores Piso Superior do Laboratório de Virologia Animal. A: Sala geladeiras; B: Sala convivência; C: Sala Estudos	18
Figura 21 - Material utilizado no preparo da solução Mix-PCR	21
Figura 22 - Etapas Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	23
Figura 23 - Etapas RT-PCR	25
Figura 24 - Exemplo de enzimas de restrição com vetor plasmidial <i>pTZ57</i>	27
Figura 25 - Ação das enzimas de restrição	27
Figura 26 - Etapa de seleção: Placa com meio LB para visualização colônias brancas e azuis	28
Figura 27 - Reação extração do plasmídeo conforme protocolo fabricante (<i>GE Life Sciences®</i>)	30
Figura 28 - Fotodocumentação do gel de agarose 2% após técnica de eletroforese.....	31
Figura 29 - Conformação química de dNTPS e ddNTPS	32
Figura 30 - Reação de Purificação utilizando <i>Kit ExoSAP-IT Affimetrix®</i>	33
Figura 31 - Reação de Sequenciamento	35
Figura 32 – Eletroferograma.....	36
Figura 33 - Fluxograma das etapas de edição das sequências para filogenia	40

LISTA DETABELAS

Tabela 1 - Exemplo Mix-PCR utilizando Kit Master Mix Ludwig Biotec®	22
Tabela 2 - Exemplo de Mix-PCR tradicional.....	22
Tabela 3 - Concentração do produto da PCR na reação de sequenciamento	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica dos ciclos de temperatura na reação de PCR23

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácido

bd – Bidestilada

bp – Base Pair (pares de base)

BVD – Diarreia Viral Bovina

dATP – *deoxyadenosine triphosphate* (Desoxiadenosina Trifosfato)

dCTP – *deoxycytidine triphosphate* (Desoxicitosina Trifosfato)

ddNTP - Didesoxinucleotídeos

dGTP – *deoxyguanosine triphosphate* (Desoxiguanina Trifosfato)

DMVP – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucléico)

dNTPs – desoxirribonucleosídeos trifosfato

ds – Duplo Segmento

dsDNA – *Deoxyribonucleic Acid double-stranded* (dupla fita ácido desoxirribonucléico)

dsRNA – *Ribonucleic Acid double-stranded* (dupla fita ácido ribonucléico)

dTTP – *deoxythymidine triphosphate* (Desoxitimina Trifosfato)

dUCTP – *deoxyuridine triphosphate* (desoxiuracila Trifosfato)

EDTA – Ácido Etileno Diamino TetrAcético

EGPA – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Fig – Figura

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

gp – Grupo

IBR – Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

Ig – Imunoglobulina

IPTG – Isopropil-tiogalactosidase

kDa – kilodaltons

LA – Látex-aglutinação

LABMAS – Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia

LB – Meio Luria-Bertani

MA-104 – Células renais de macaco Rhesus

MCS – *Multiple cloning site* (Múltiplos sítios de clonagem)

MDBK - Madin and Darby Bovine Kidney

ME – Microscopia Eletrônica

mM – Milimolar

n – número total de amostras

nm – Nanômetro

NSP – *Non Structural Protein* (proteínas não-estruturais)

Nt – Nucleotídeos

ORF – Open Reading Frame (sequência aberta de leitura)

PBS – Tampão Salina-Fosfato

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação da polimerase em cadeia)

pH – Potencial Hidrogeniônico

q.s.p. – Quantidade Suficiente Para

qPCR – Quantitative or Real-Time Polymerase Chain Reaction (reação da polimerase em cadeia quantitativa ou em tempo real)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

RNAfd – Ácido Ribonucléico Fita Dupla

RT – Reverse Transcription (transcrição reversa)

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

SN – Semi-Nested PCR

ss-PAGE – silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – Tampão Tris-borato-EDTA

TRIS – Hidroximetil-amino-metano

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”

USP – Universidade de São Paulo

VP – Viral Protein (proteína viral)

VPS – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosida

μ g – Micrograma (10^{-6} grama)

μ L – Microlitros (10^{-3} mL)

μM – Micromolar

DEPC – Diethylpyrocarbonate (Dietilpirocarbonato)

TE – Tris-EDTA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. LOCAL DE ESTÁGIO.....	3
2.1 LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA E SOROLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	3
2.1.1 ROTINA LOCAL ESTÁGIO	9
2.2 LABORATÓRIO DE VIROLOGIA ANIMAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA	11
2.2.1 ROTINA LOCAL ESTÁGIO	18
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	20
3.1 EXTRAÇÃO ÁCIDO NUCLÉICO	20
3.2 AMPLIFICAÇÃO ÁCIDO NUCLÉICO	21
3.2.1 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA	21
3.2.1.1 VARIANTES DA PCR	24
3.2.2 CLONAGEM.....	25
3.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	30
3.4 SEQUENCIAMENTO.....	31
3.5 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA APLICADAS À ANÁLISE GENÔMICA	37
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
5. REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS	46

1. INTRODUÇÃO

O estágio supervisionado obrigatório em medicina veterinária, tem por objetivo finalizar a graduação com a vivência profissional na área de interesse do aluno, desenvolvendo e consolidando conhecimentos teóricos e práticos adquiridos durante a graduação. Permite e estimula a constante busca de informações e conhecimentos na área de atuação, bem como o aprimoramento das habilidades nas relações interpessoais, e na postura profissional.

Visando o crescimento profissional a área de eleição para realização do estágio supervisionado foi a medicina veterinária preventiva que, inserida junto a outras faculdades da saúde, alberga o conceito "*One Health*", em que saúde humana, animal e ambiental são complementares e interdependentes. O advento das análises biomoleculares, de diferentes áreas da medicina veterinária preventiva tem permitido elucidação de processos patogênicos e epidemiológicos das doenças infecciosas de animais. Na virologia a pesquisa de vírus não adaptados ao cultivo celular *in vitro*, ou de difícil detecção por técnicas convencionais, tornou-se possível e aplicável. Dessa forma, com o potencial para a descoberta de novos patógenos correlacionados às doenças não elucidadas anteriormente, permitiu desenvolver um sistema de classificação das espécies de acordo com características genotípicas e novos vírus estão sendo descobertos por diferentes técnicas moleculares. Atualmente, constitui uma tendência mundial o uso da biologia molecular para o estudo dos vírus e sua popularização tem permitido grandes avanços, auxiliando no diagnóstico, na epidemiologia, e no controle e prevenção de doenças de interesse em medicina veterinária.

O período de estágio foi dividido em duas instituições que desenvolvem pesquisas de grande importância e interesse para profissionais da medicina veterinária preventiva - virologia animal. Ambas, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Elisabete Takiuchi. A primeira parte do estágio foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS) pertencente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) -

Universidade de São Paulo (USP), sob orientação do Prof. Dr. Fábio Gregori, no período de 12 de agosto a 27 de setembro de 2013. A segunda parte do estágio foi realizada no Laboratório de Virologia Animal pertencente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) sob orientação da Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri, durante o período de 30 de setembro a 22 de novembro de 2013.

Nesse relatório de estágio supervisionado são descritas a infraestrutura e rotina de trabalho dos locais, sendo escolhidas e relatadas três importantes técnicas de biologia molecular, utilizadas na pesquisa e diagnóstico de vírus de relevância em medicina veterinária, das quais realizei e acompanhei as etapas junto aos pesquisadores. Serão elas, a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e suas variáveis, clonagem, e sequenciamento. Além dessas técnicas de biologia molecular, utilizadas na pesquisa e diagnóstico viral de interesse em medicina veterinária, pude acompanhar e trabalhar com as análises dos dados obtidos, através de programas de bioinformática para análise das sequências.

2. LOCAL DE ESTÁGIO

2.1 LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA E SOROLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

A primeira etapa do estágio curricular supervisionado em medicina veterinária foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia – LABMAS. Sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Gregori, e supervisão da Prof^a Dr^a Elisabete Takiuchi, no período de 12 de agosto a 27 de setembro de 2013, totalizando 280 horas. Na capital do estado de São Paulo, a Universidade de São Paulo - USP, inseriu em 1919 a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, localizada na Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 da cidade universitária da USP (Figura 1). Após 50 anos da fundação da FMVZ-USP, em 1969, foi instalado o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde – VPS, responsável por desenvolver atividades de formação, pesquisa e extensão, nas áreas de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Higiene dos Alimentos (Figura 1). O LABMAS, juntamente com outros sete laboratórios, compreende a estrutura laboratorial do VPS.



Figura 1 - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A: Fachada do prédio da FMVZ da USP; B: Entrada principal do Departamento Medicina Veterinária Preventiva

As linhas de pesquisa do LABMAS estão concentradas na análise biomolecular e epidemiológica de coronavírus, rotavírus, anemia infecciosa equina, torque-tenovírus,

raiva, circovírus, e influenza vírus, sob a coordenação dos Professores Doutores Fábio Gregori, Leonardo José Richtzenhain e Paulo Eduardo Brandão. Juntos, os três professores pesquisadores, orientam um grupo composto por dez alunos de doutorado, com apoio laboratorial das técnicas Dr^a Sueli AkemiTaniwaki, e MSc. Sheila Oliveira de Souza Silva.

O LABMAS está estruturado em três principais setores, denominados Anexo I, II e III (Figura 2). O “Anexo I - Biologia Molecular Aplicada” é composto por uma sala de recepção e escritório, com controle de entrada por leitor biométrico digital, que dá acesso à “Sala de cultivo celular” (Figura 3).

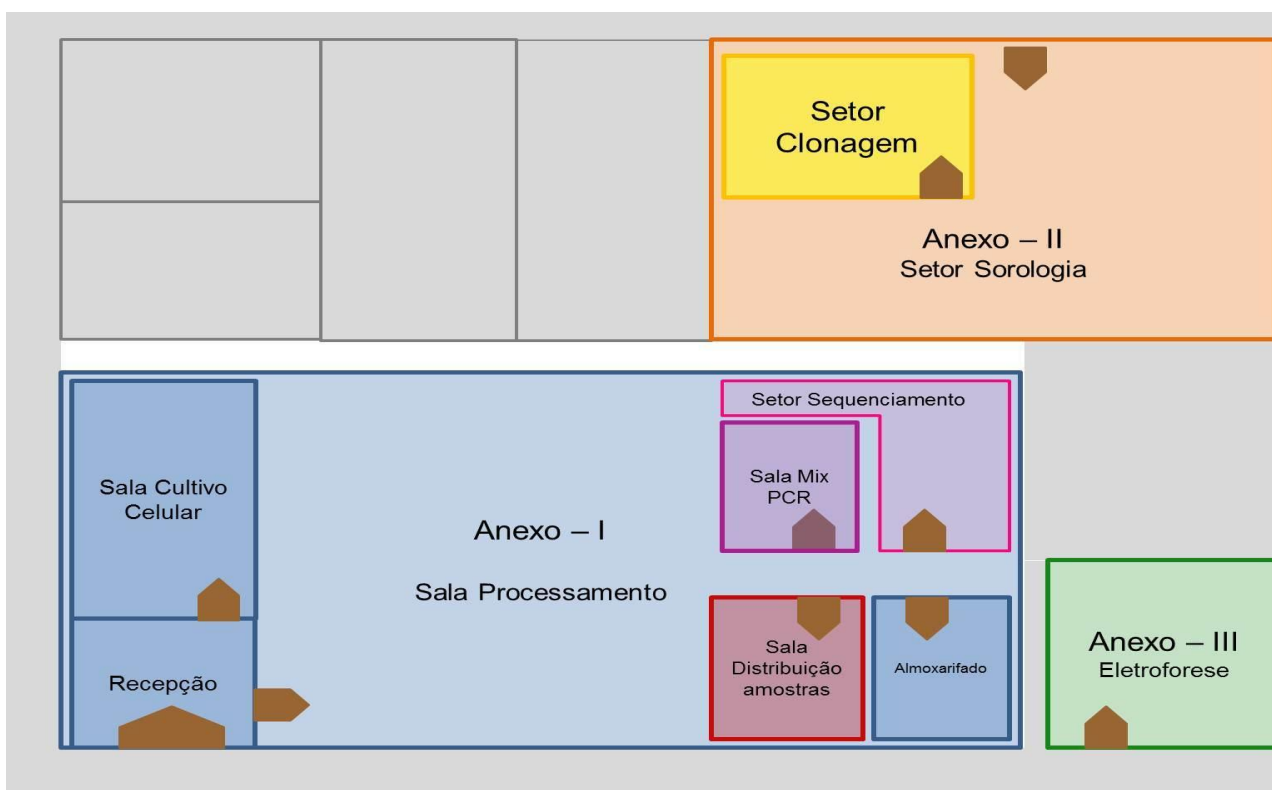


Figura 2 - Planta baixa LABMAS

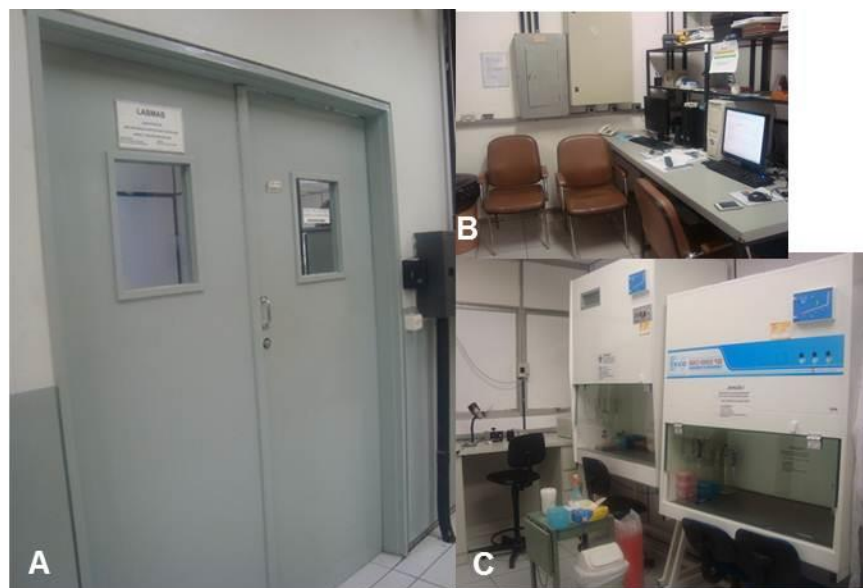


Figura 3 - Anexo I do LABMAS - Biologia Molecular Aplicada A: Entrada do Anexo I LABMAS; B: Recepção e escritório; C: Sala cultivo celular

Nesse mesmo anexo, há uma segunda divisão que compreende a “Sala de Processamento”, onde é realizada a maioria das atividades. Este espaço de temperatura controlada, contém bancadas para processamento de biológicas, capelas para manipulação de material com risco químico, termocicladores para amplificação de material genético pelas técnicas PCR, RT-PCR, qPCR. A sala de processamento também possui geladeiras para armazenar reagentes e soluções, separada das geladeiras contaminadas utilizadas para armazenamento das amostras biológicas (Figura 4).



Figura 4 - Sala de Processamento do LABMAS

Ainda nessa sala, há quatro subdivisões, a “Sala Mix PCR”, para preparo de soluções *mix* para amplificação genômica (área livre de RNA/DNA). “Sala de distribuição das amostras” para distribuição do *mix*-PCR junto ao material genético extraído (área contaminada – não livre de RNA/DNA) (Figura 5).



Figura 5 - Subdivisões do Anexo I do LABMAS A: Sala Mix-PCR; B: Sala de distribuição das amostras

O “Setor de Sequenciamento”, comporta o equipamento de sequenciamento automático por capilar, modelo *ABI3100 AppliedBiosystem®*, que atende a demanda de exames de todo o VPS, bem como de solicitações externas. No almoxarifado estão armazenados reagentes e outros materiais de consumo de todo o LABMAS (Figura 6).



Figura 6 - Subdivisões do Anexo I do LABMAS A: Setor Sequenciamento; B: Almoxarifado

O “Anexo II – Sorologia”, possui uma entrada separada, que impossibilita o fluxo reverso ao Anexo I, cujo principal objetivo é evitar a contaminação com material genético amplificado do anexo I. Além de geladeiras para armazenar o material amplificado, incluem-se nesse anexo os equipamentos necessários para corrida de gel por eletroforese e para quantificação de material genético. Há também uma pequena área restrita, denominada “Sala de Clonagem”, onde são realizadas todas as técnicas de clonagem gênica (Figura 7).



Figura 7 - Anexo II do LABMAS - Sorologia A, B, C: Sala Sorologia; D: Placa informativa do setor de clonagem; E: Entrada do setor clonagem; F: Parte interna restrita à técnica clonagem

O “Anexo III – Sala de eletroforese”, consiste de uma sala isolada, de risco químico, e de uso conjunto com outros laboratórios do VPS. A utilização dessa sala limita-se à fase de coloração e visualização dos géis de agarose corados com brometo de etídio, o alto potencial carcinogênico justifica a destinação de um espaço físico restrito para esse fim (BARROS, et al., 2003) (Figura 8).

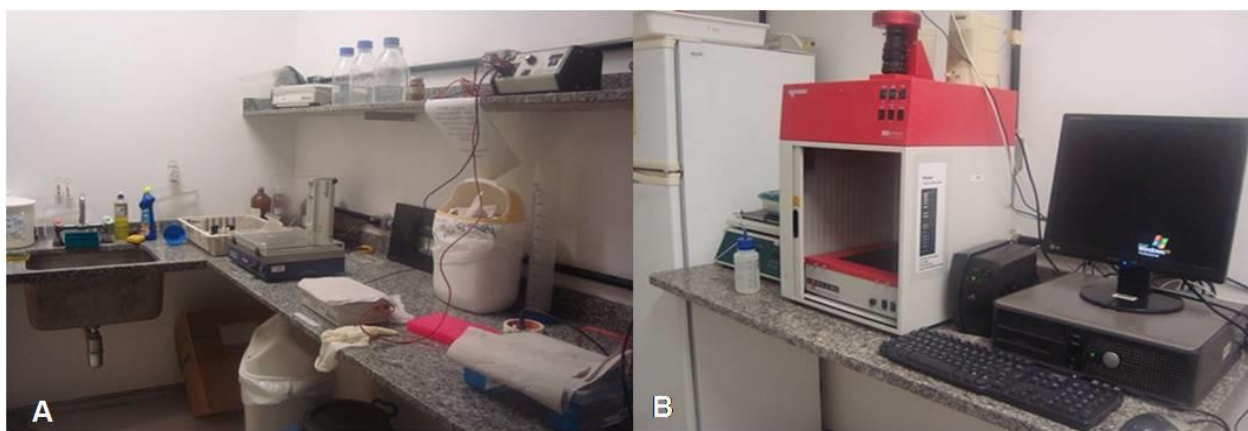


Figura 8 - Anexo III do LABMAS – Sala Eletroforese A: Bancada e equipamentos para eletroforese; B: Sistema de fotodocumentação de géis

2.1.1 ROTINA LOCAL ESTÁGIO

A rotina laboratorial do LABMAS está voltada para a pesquisa e aulas de biologia molecular para alunos da graduação e pós graduação da FMVZ, e intercambistas. O preparo de materiais estéreis, o controle do estoque de reagentes e consumíveis, soluções de desinfecção de bancadas e materiais de uso comum são de responsabilidade das técnicas.

Considerando um fluxograma de atividades do LABMAS (Figura 10), a primeira delas corresponde ao recebimento de amostras biológicas. Conforme os critérios estabelecidos pelo LABMAS, são aceitas somente amostras congeladas ou resfriadas que estejam devidamente embaladas e identificadas. As amostras não processadas imediatamente são mantidas em freezer ou geladeira, de uso específico para armazenamento de material biológico. O descongelamento é sempre realizado em geladeira.

O laboratório recebe principalmente amostras de natureza fecal e fragmentos de órgãos obtidos de necropsia. No caso dos órgãos, os fragmentos são macerados utilizando instrumental cirúrgico esterilizado, e de uso individual por órgão, mesmo que seja proveniente de um mesmo animal ou lote. Após macerar, as amostras são armazenadas em microtubos de 1,5 ml e mantidas congeladas. O restante do órgão macerado é estocado em freezer de amostra biológica. As amostras brutas de fezes são suspensas em solução tampão livre de nucleases. Todo o lixo biológico gerado é devidamente descartado, dividido em lixo biológico/contaminado, lixo químico e lixo comum. A extração do material genético segue diferentes protocolos, de acordo com o *Kit* utilizado, o material biológico e material genético do vírus pesquisado (DNA/RNA). Essa etapa é realizada sempre em cabines de fluxo laminar, justificada pelo risco químico dos reagentes utilizados (Figura 09).



Figura 9 - Caboine de fluxo laminar do Anexo I – LABMAS

Todas essas etapas iniciais são realizadas na sala de processamento do Anexo I. Em seguida, encaminha-se a amostra extraída para a “sala de distribuição de amostras” onde são adicionadas aos tubos contendo a mistura adequada para a reação de amplificação, previamente preparada na “Sala de *Mix-PCR*”. O material segue para os termocicladores disponíveis conforme agendamento na sala de processamento do Anexo I. Nas reações de *Nested* ou *Semi-Nested-PCR*, que compreendem uma segunda etapa de amplificação pós PCR, o material amplificado da primeira etapa é distribuído em caboine de fluxo específica do Anexo II, e retorna aos termocicladores do Anexo I. Essa medida visa minimizar o risco de contaminação por material amplificado no Anexo I.

No Anexo III as amostras são aplicadas em gel de agarose para eletroforese, e após a corrida são fotodocumentadas. Todo o material que entra nessa sala não retrocede para os ambientes anteriormente citados.

A etapa de preparo das amostras para sequenciamento inicialmente é feita e armazenada no “Setor de Sorologia” do Anexo II e posteriormente processadas pelas técnicas Sueli e Sheila no “Setor de Sequenciamento” do Anexo I. A linha final do processamento é a análise do eletroferograma, de acordo com objetivo da pesquisa (Figura 10).

Medicina Veterinária Preventiva, o qual alberga atualmente doze laboratórios, dentre eles o Laboratório de Virologia Animal, com estrutura física independente dos outros laboratórios do DMVP – UEL (Figura 11).



Figura 11 – Prédio do Laboratório de Virologia Animal – UEL

Toda equipe do Laboratório de Virologia Animal está sob a coordenação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri e Prof^ª. Dr^ª. Alice Fernandes Alfieri. O quadro de alunos da pós-graduação é formado por sete doutorandos e oito mestrandos, que se subdividem nas linhas de pesquisa de rotavírus suíno e bovino; kobuvírus; herpesvírus bovino; coronavírus bovino; vírus da diarreia viral bovina; torque-tenovírus suíno; influenza equina; papilomavírus bovino e equino; herpesvírus canino; parvovírus canino; influenza vírus canino; adenovírus canino; coronavírus canino e vírus da cinomose dos canídeos. Além da pesquisa realizada pelos pós graduandos, o laboratório conta com o apoio técnico da Med. Vet. MSc. Juliana Torres Tomazi Fritzen, Marcos Vinicius de Oliveira e Renilda Calabrio Cianca, juntamente com duas médicas veterinárias residentes são responsáveis pela rotina de diagnóstico de amostras externas para IBR e BVD; rotavirose de suínos e bovinos e parvovirose canina.

O laboratório está estruturalmente organizado para atender as demandas da pesquisa e rotina de diagnóstico virológico animal. A entrada de pessoas é controlada por leitor biométrico digital. No piso inferior estão localizadas as salas dos residentes, e a sala de permanência dos técnicos (Figura 12), após está situada a “Área suja” (Figura 13) onde são realizadas as etapas de recebimento, armazenagem e processamento inicial das amostras para extração do material genético, além de preparo de soluções. A

área suja é composta por bancadas de trabalho, pias, equipamentos de apoio, geladeiras exclusivas para armazenar reagentes e soluções, e geladeiras para destinação de material biológico contaminado. Todos os equipamentos são de uso comum entre os técnicos, doutorandos, mestrandos, residentes e estagiários. Entretanto, os reagentes e soluções são divididos por equipe de trabalho (conforme vírus estudado), para reduzir probabilidade de contaminação.



Figura 12 - Planta baixa do piso inferior do Laboratório de Virologia Animal - UEL



Figura 13 - Área suja do Laboratório de Virologia Animal

Da “Área suja” permite-se o acesso a seis espaços de uso bem definidos: “I Sala de Cultivo de Células”, composta por pia, capela de fluxo laminar; banho-maria, e estufa com controle de CO₂ de uso exclusivo para repique e manutenção de garrafas de cultivo células não contaminadas. “II Sala de Soroneutralização”, contendo pia, capela de fluxo laminar, e materiais de uso exclusivo à técnica de diagnóstico de soroneutralização. “III Sala de Macerado” é considerada uma ramificação da área suja, onde está alocada a cabine de segurança biológica, para manipulação de órgãos e outros materiais de risco zoonótico. A sala possui também uma estufa com controle de CO₂ para incubação de material contaminado, como as placas dos testes de soroneutralização, e garrafas de cultivo de célula com inóculo viral. “IV Sala de purificação”, com equipamentos de uso restrito ao processamento de amostras amplificadas para etapa pré-sequenciamento, e quantificação das amostras. “V Sala de Clonagem” que também recebe material amplificado pela PCR, com equipamentos (cabine de manipulação; agitador-incubador) e materiais de uso necessário e restrito ao seu ambiente (Figura 14).



Figura 14 - Setores de processamento do Laboratório de Virologia Animal. A: Sala de cultivo de células; B: Sala de Soroneutralização; C: Sala Macerado; D: Sala Purificação; E: Sala Clonagem

Ainda no piso inferior estão o “Almoxarifado” com estoque de reagentes, consumíveis e materiais de uso no laboratório, a “Sala de Lavagem e Esterilização” composta por pia de lavagem; destilador de água, estufas de secagem, autoclaves e armários para armazenar material limpo e autoclavado (Figura 15). “Sala de Eletroforese”, utilizada para preparo, corrida e fotodocumentação dos géis de agarose com produtos amplificados. Os materiais e equipamentos tem uso limitado à sala, devido ao risco químico do brometo de etídio (Figura 16).



Figura 15 - Sala Lavagem e Esterilização do Laboratório de Virologia Animal



Figura 16 - Sala de Eletroforese do Laboratório de Virologia Animal

No piso superior (Figura 17), está o setor de biologia molecular do laboratório, chamado de “Área Limpa” onde estão disponíveis bancadas de trabalho; e termocicladores para amplificação do material genético (Figura 18).

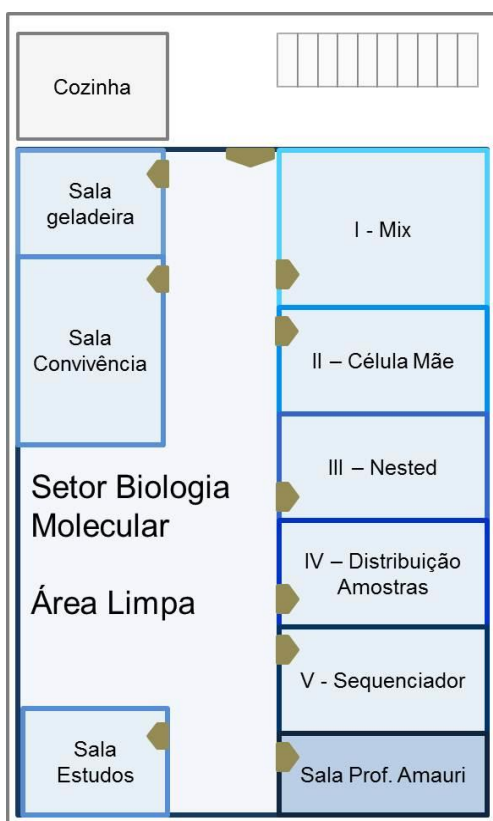


Figura 17 - Planta baixa do piso superior do Laboratório de Virologia Animal



Figura 18 - Área limpa do Laboratório de Virologia Animal

O setor de biologia molecular se subdivide em cinco salas. “I Sala de Mix”, onde estão os reagentes para o preparo de misturas adequadas para amplificação do material genético. A manipulação de material amplificado deve ocorrer sempre após a entrada nesta sala, sendo o fluxo retrógrado impossibilitado, visando reduzir as possibilidades de contaminação por material amplificado; “II Sala de Célula Mãe”, é o ambiente mais limpo e com fluxo de pessoas restrito. É onde estão armazenadas as culturas de células utilizadas no repique celular, sendo de extrema importância garantir um ambiente livre de contaminações químicas, físicas, e biológicas; “III Sala de *Nested*”, local onde são manipuladas apenas amostras amplificadas que sofrerão uma segunda etapa de amplificação, cujo propósito é o de evitar a contaminação cruzada durante o processamento das amostras; “IV Sala de Distribuição de Amostras” é utilizada na manipulação de amostras não amplificadas, provenientes da extração do material genético; e a “V Sala de Sequenciamento”, ambiente com temperatura controlada, onde encontra-se o aparelho *ABI3500 Applied Biosystem®* utilizado no processo de sequenciamento, o preparo das amostras que irão para o sequenciamento é realizado na área limpa do setor de biologia molecular (Figura 19).



Figura 19 - Setores de Biologia Molecular do Laboratório de Virologia Animal. A: Sala de Mix; B,C: Sala de célula mãe; D: Sala de *Nested*; E,F: Sala de distribuição de amostras; G: Sala de sequenciamento

Além disso, no piso superior, há a “Sala de Geladeiras”, onde estão organizadas geladeiras e freezers, inclusive freezer -80°C; A “Sala de Convivência”; e a “Sala de Estudos” utilizadas pelos pós graduandos. (Figura 20).



Figura 20 - Setores Piso Superior do Laboratório de Virologia Animal. A: Sala geladeiras; B: Sala convivência; C: Sala Estudos

Toda a área do Laboratório de Virologia está setorizada para reduzir as probabilidades de contaminação cruzada, pois gera contaminantes biológicos e químicos. Além disso, o grupo conta com reuniões e sistema de e-mails para comunicação interna visando sempre o controle constante de todos os envolvidos em manter um ambiente limpo e livre de contaminação por uso indevido ou fluxo retrógrado dos processos.

2.2.1 ROTINA LOCAL ESTÁGIO

As atividades do Laboratório de Virologia Animal da UEL estão divididas entre as análises de rotina, sob responsabilidade dos técnicos e residentes e nas análises da pesquisa dos mestrandos e doutorandos. As amostras que chegam são armazenadas em geladeira de recebimento de amostras, na temperatura de 4°C, e antes de iniciar o processamento, é realizada a entrada das amostras utilizando um código interno do laboratório.

Das análises realizadas na rotina de prestação de serviços incluem o diagnóstico indireto de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Diarreia Viral Bovina (BVD) pela técnica de soroneutralização, e diagnóstico de rotavírus pela técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA). Como rotina também é necessário o

contínuo suprimento de garrafas de cultivo celular de linhagem *MDBK*, necessários para a técnica de soroneutralização.

Nas análises de pesquisa, como o ponto central são as técnicas biomoleculares, a primeira etapa é a extração do material nucléico de amostras biológicas (soro, órgãos, urina, fezes) refrigeradas ou congeladas. A etapa de extração do material nucléico é realizada na “Área Suja”. E o produto da extração é então armazenado, à temperatura de 4°C, para posterior utilização nas técnicas de PCR realizadas na “Área Limpa”. O preparo da reação de PCR é realizado na “I Sala de Mix” e segue para “IV Sala de distribuição de amostras” onde é adicionado o produto da extração do ácido nucléico proveniente de amostra. Os microtubos destinados à PCR são colocados nos termocicladores no “Setor de Biologia Molecular - Área Limpa”, e após término do processo são armazenados na “Sala de geladeira”. Posteriormente conforme o protocolo de amplificação utilizado, se necessário realiza-se as etapas de *Nested* ou *Semi-Nested*, com preparo da reação na “I Sala de Mix” e distribuição das amostras na “III Sala de Nested”, para processamento nos termocicladores do “Setor de Biologia Molecular - Área Limpa”. As amostras amplificadas seguem para “Sala de Eletroforese” para corrida eletroforética e fotodocumentação. As amostras destinadas ao sequenciamento são recortadas do gel de agarose e enviadas à “IV Sala de Purificação” para purificação com Kits, e quantificação pelo aparelho *QuBitFluorometerInvitrogen®*. A reação de sequenciamento é realizada somente às terças-feiras no “Setor de Biologia Molecular - Área Limpa” para aplicação no aparelho *ABI3500 AppliedBiosystem®* da sala “V do Sequenciador”.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades descritas a seguir compreendem práticas comuns realizadas em ambos os laboratórios estagiados, cujas particularidades são destacadas e descritas nos momentos apropriados.

3.1 EXTRAÇÃO ÁCIDO NUCLEÍCO

A extração de ácido nucléico é a etapa inicial e primordial para uma o sucesso da análise molecular.

No LABMAS/USP realizei o recebimento e processamento de amostras biológicas para diagnóstico de bronquite infecciosa e metapneumovírus a partir de macerado de órgãos dos sistemas respiratório, reprodutor, e digestório; diagnóstico de rotavírus a partir de extrato fecal de alpacas; e rotavírus e coronavírus de swabs anais de aves silvestres, utilizando Kits de extração *TRIzol® Plus RNA Purification Kit – Life Technologies* (anexo I e II), e *Kit Purelink Viral DNA/RNA/Minikit - Invitrogen®* (anexo III). No Laboratório de Virologia Animal/UEL utiliza-se a associação das técnicas fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico e sílica/ isotiocianato de guanidina para extração do ácido nucléico conforme modificações descritas por Alfieri et al. (2006) (anexo IV e V). A partir de material de natureza fecal realiza-se o diagnóstico de rotavírus suíno e bovino; para vírus sincicial respiratório bovino o material de eleição é o swab de aparelho respiratório. A partir de macerado de material de necropsia de cães atendidos no Hospital Veterinário da UEL com sinais clínicos compatíveis, faz-se a extração do ácido nucléico para realizar o diagnóstico diferencial de herpesvírus e adenovírus canino de macerado de pulmão, cerebelo, linfonodo, baço e fígado; parvovírus e coronavírus canino de macerado de intestino, coração, linfonodo mesentérico e fígado; vírus da influenza canina de pulmão e rim; e para o vírus da cinomose canina são testados todos os órgãos acima citados. Quando o material biológico enviado é urina, realiza extração e possibilita o diagnóstico para todos os agentes exceto influenza e coronavírus canino.

3.2 AMPLIFICAÇÃO ÁCIDO NUCLEÍCO

3.2.1 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA

Na área de medicina veterinária preventiva, a técnica de PCR é amplamente utilizada a partir de amostras biológicas de diferentes naturezas.

O princípio da técnica de PCR é baseado na replicação *in vitro* de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial, o processamento requer repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA molde, anelamento dos oligonucleotídeos que funcionam como iniciadores da reação e polimerização das novas fitas, utilizando cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) como substrato. (SNUSTAD et al., 1997; TAYLOR, 1991; WATSON et al., 2006). Portanto para uma PCR são necessários: um DNA alvo de amostra biológica; um par de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos, de tamanho de 15-30pb, denominado *primer*, que devem ser complementares à fita molde; os quatro desoxirribonucleosídeos (dNTPs) dGTP, dCTP, dATP, dTTP; a enzima Taq DNA polimerase; cloreto de magnésio ($MgCl^{2+}$) cofator da enzima e tampão para manutenção do pH e promotor da máxima eficiência enzimática; água ultrapura (Figura 21).

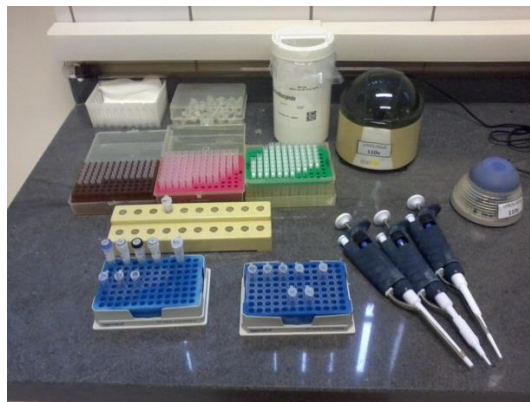


Figura 21 - Material utilizado no preparo da solução Mix-PCR

No LABMAS/USP acompanhei e preparei solução mix para diagnóstico de vírus RNA como rotavírus, coronavírus aviário e metapneumovírus utilizando o *Kit Master Mix Ludwig Biotec®* ou *Kit GoTaq Green Master Mix – Promega®*, sendo necessário

somente adicionar ao Kit, os primers de escolha e o material proveniente da extração ou RT-PCR (Tabela 1 e 2). Uma outra vantagem do *Kit GoTaq Green Promega®*, é que este contém dois corantes incorporados (azul e amarelo) não sendo necessário na corrida de eletroforese em gel de agarose adicionar o tampão de amostra, sendo diretamente aplicado no gel após a saída do termociclador (Promega^a® Manual).

Tabela 1 – Exemplo Mix-PCR utilizando *Kit Master Mix Ludwig Biotec®*

Reagente	Volume
Kit Master Mix Ludwig Biotec®	20 µl
Primer Sense	1,25 µl
Primer Antisense	1,25 µl
Total	22,5 µl
+ cDNA/ DNA	2,5 µl

Tabela 2 – Exemplo Mix-PCR tradicional

Reagente	Volume
Buffer [10X]	2,5 µl
MgCl ²	0,75 µl
dNTP [1x]	1 µl
Primer Sense	0,5 µl
Primer Antisense	0,5 µl
Enzima Taq	0,25 µl
H ₂ O	17 µl
Total	22,5 µl
+ cDNA/ DNA	2,5 µl

O procedimento se baseia em três etapas (Figura 22), a primeira é a desnaturação da molécula de DNA por aquecimento a 92° - 100°C durante 15-30 segundos, para que se rompa as ligações de hidrogênio, separando a dupla fita de DNA. Na segunda etapa ocorre a hibridização ou anelamento do primer à fita de DNA alvo por pontes de hidrogênio (WATSON et al., 2006; ZAHA et al., 2003) a uma temperatura variável 45°-60°C durante 30-60 segundos, conforme a composição das bases do *primer*. Na etapa três de replicação, ocorre a extensão, acoplando as bases nitrogenadas, pela ação da enzima DNA Polimerase, se ligando a extremidade 3' do primer, e sintetizando exclusivamente no sentido 5' → 3' da fita DNA alvo, com temperatura ótima de ação de 70°-72°C durante 60-90 segundos.



Figura 22 - Etapas Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Essas etapas são repetidas muitas vezes, e amplificação ocorre de maneira exponencial. O número de ciclos para uma ótima amplificação depende da concentração inicial de DNA e da eficiência das etapas da PCR, geralmente 25-35 ciclos são suficientes para produzir 100ng/1 μl de uma única amostra de 50ng de DNA genômico (TAYLOR, 1991). Na etapa final, acrescenta-se um passo de 70°C - 72°C durante 4-6 minutos, para extensão final dos produtos amplificados (PIERCE, 2011; SNUSTAD, et al., 2000) e posteriormente atinge uma temperatura de 0°C - 4°C para conservação das amostras até o momento de estocagem – resfriadas 4°C , ou congeladas -20°C (Gráfico 1) para posterior aplicação em corrida de eletroforese, ou clonagem.

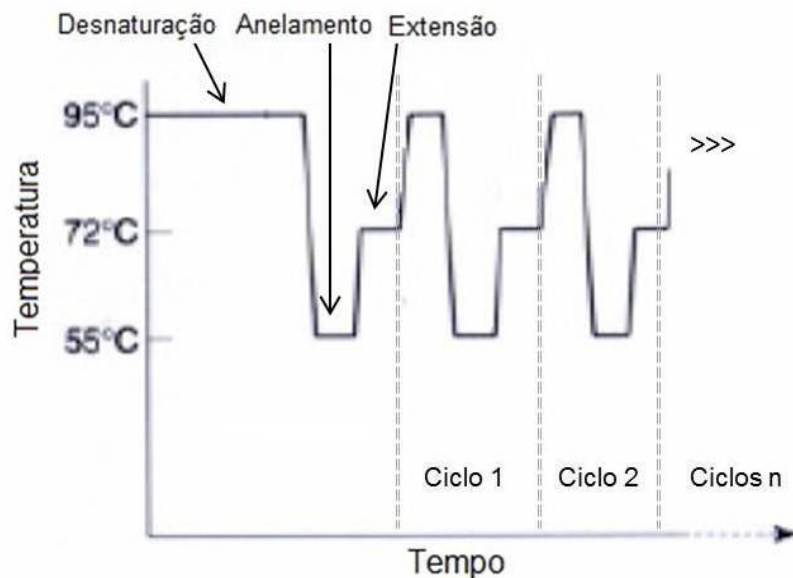


Gráfico 1 - Representação gráfica dos ciclos de temperatura na reação de PCR

Na otimização da PCR e suas variantes é fundamental maximizar a atividade enzimática da Taq DNA Polimerase. A flexibilidade da técnica permite o uso de temperaturas variáveis, contudo a Taq DNA Polimerase tem sua meia-vida reduzida com temperatura superior a 95°C, o tempo de desnaturação em excesso também pode reduzir a capacidade enzimática da Taq DNA Polimerase. No caso dos *primers* o binômio tempo/temperatura de hibridização é uma importante variável, e sua temperatura ótima é dependente da composição das bases nitrogenadas presentes nos *primers*, o excesso de dGTP e dCTP, exige uma temperatura maior de anelamento, além de um maior tempo, devido às ligações de hidrogênio triplas (ZAHA et al., 2003).

A técnica de PCR e suas variantes oferecem especificidade, sensibilidade e flexibilidade, além de rapidez, facilidade, e relativo baixo custo. Porém cuidados em relação à pureza do DNA alvo, são essenciais para que não ocorra inibição da PCR. Por isso, é fundamental que a técnica de extração do material genético garanta a integridade do produto, com pureza e rendimento (WALKER e RAPLEY, 1999). Bem como o armazenamento das amostras congeladas ou resfriadas, eluídas junto à compostos como dietilpirocarbonato 1% (DEPC) ou tampão Tris-EDTA (pH 7,4 – 8,0) (TE), que reduzem ação de nucleases. Esses cuidados preconizados e observados em ambos os laboratórios estagiados, visa garantir o armazenamento de amostras com o mínimo de perdas.

3.2.1.1 VARIANTES DA PCR

Quando trabalha-se com vírus de material genético RNA, como rotavírus, coronavírus, alvo de pesquisa em ambos laboratórios estagiados, os morbillivírus utilizados em pesquisas no Laboratório de Virologia Animal/UEL, e os paramyxovírus, nas PCRs no LABMAS/ USP, exige-se duas etapas anteriores à PCR (Figura 23) pela característica do material genético RNA. Uma primeira etapa para desnaturação das fitas e a segunda para conversão de RNA em cDNA através da ação da Transcriptase Reversa, que é uma enzima DNA polimerase RNA dependente. No LABMAS e no

Laboratório de Virologia Animal/ UEL utiliza-se a *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* da *Invitrogen®*.

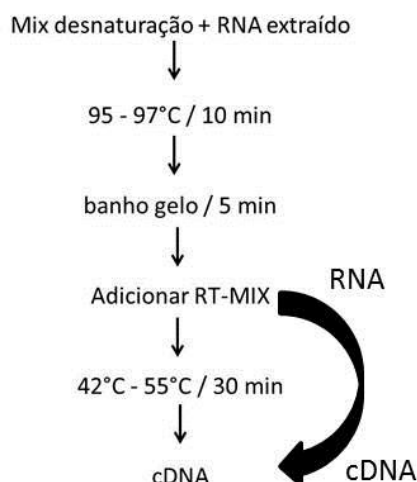


Figura 23 - Etapas RT-PCR

Outra variação utilizada é a *Nested-PCR* ou *Semi Nested-PCR*. A *Nested-PCR* é utilizada na rotina de diagnóstico de metapneumovírus aviário no LABMAS/USP. A técnica emprega uma segunda amplificação do DNA alvo utilizando dois novos oligonucleotídeos iniciadores internos aos utilizados na primeira etapa de amplificação e visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método (MOLINA e TOBO, 2003).

A reação de *Multiplex-PCR*, onde mais de um segmento genômico é amplificado em uma mesma reação são utilizados mais de um par de *primers* com alvos genômicos específicos. No Laboratório de Virologia Animal/UEL essa técnica é utilizada para diferenciação molecular dos genótipos de rotavírus baseada nas proteínas do capsídeo VP4 (P tipo) e VP7 (G tipo). No LABMAS/USP a *Multiplex-PCR* está associada à *Nested-PCR* no diagnóstico de metapneumovírus aviário.

3.2.2 CLONAGEM

A clonagem é muito utilizada atualmente, associada à PCR, quando se trabalha com sequenciamento de genes ou regiões hipervariáveis. No LABMAS/USP o

acompanhamento e realização foram com base na pesquisa de doutorandos que trabalham com longos fragmentos de alta variabilidade de coronavírus felino e torque-teno vírus suíno. No Laboratório de Virologia Animal/UEL, apesar da clonagem ser utilizada na pesquisa para produção de *virus-like particles*, produzidas a partir da proteína *L1* de papilomavírus equino, só foi possível acompanhar parcialmente as técnicas utilizadas, pois na época estava sendo realizada a padronização da técnica para amplificação de fragmento extenso de torque-teno vírus suíno.

A técnica se divide em dois principais pontos: ligação de um inserto, originado da clivagem e amplificação do fragmento de interesse em um vetor de clonagem (geralmente plasmídeo), formando a molécula de DNA recombinante. Na segunda etapa, denominada transformação introduz-se o DNA recombinante em uma célula hospedeira competente (ZAHA et. al., 2003; KREUZER et. al., 2002; WATSON et. al., 2006). Quando se utiliza produto de PCR para inserto, o fragmento gerado possui ambas extremidades *dATP* pela atividade terminal transferase das enzimas polimerases sem revisão pós transcricional (como a Taq DNA polimerase utilizada na PCR) que adiciona *dATP* em ambas extremidades do produto da PCR. Essa característica se torna vantajosa na etapa de ligação uma vez que os vetores plasmidiais comerciais utilizados em ambos laboratórios já vem clivados na MCS do gene *LacZ* com extremidades coesivas *dTTP* (*Thermo Scientific®* manual), sendo desnecessário uma etapa de manipulação para clivagem do plasmídeo utilizando-se de enzimas de restrição as chamadas “tesouras moleculares” que reconhecem sequências curtas (MCS), palindrômicas de 4-12pb alvo-específicas (Figura 24), (ZAHA, et al., 2003).

Para a etapa de ligação são necessários um vetor de clonagem; enzima T4 DNA *ligase* e o fragmento alvo para amplificação. Um vetor de clonagem deve essencialmente ser capaz de replicar na célula hospedeira; possuir um ou mais sítios de clonagem únicos para enzimas de restrição (MCS); possuir um ou mais sistemas de seleção (antibióticos), e DNA fita dupla, tudo isso com baixo peso molecular (CARUSO, 2007).

Os vetores plasmidiais utilizados no LABMAS eram provenientes do *Kit InsTAclone PTZ57 ThermoScientific®* (Figura 23) e *Kit Plasmídeo pGEM-T Promega®*. No Laboratório de Virologia Animal/UEL o *Kit* utilizado era *TOPO TA Cloning*

justificada pelos problemas advindos na aquisição de células comerciais, que durante o transporte não permaneceram congeladas e perdiam a viabilidade da célula para receber o inserto com o fechamento dos poros da membrana celular, ou seja as células perdiam a sua competência. Na reação de quimiocompetência (anexo VII) realizada no LABMAS/USP, o cálcio torna a solução hipersaturada com cargas positivas, e mascara a carga negativa da molécula de DNA recombinante, permitindo a entrada pelos poros da membrana que estão abertos pelo processo térmico do frio. Nessa etapa a manipulação deve ser cuidadosa, pois as células estão frágeis e qualquer choque físico pode lesionar as células, reduzindo a eficácia da técnica (WATSON, et. al., 2006; ZAHA, et. al., 2003). O inserto é adicionado às células competentes, e após recebe um choque térmico pelo calor, que fecha os poros da membrana celular (Anexo VIII).

Prepara-se as placas com meio LB com ampicilina 10%, e antes de plaquear com as células competentes adiciona-se IPTG e XGal na placa, que induz a atividade da enzima β -galactosidase e o XGal que é um substrato cromogênio da atividade da β -galactosidase e forma um precipitado azul quando clivado. As células são incubadas à 37°C para crescimento das colônias, dessa forma é possível diferenciar visualmente colônias contendo células não-recombinantes (ampicilina resistentes/ $LacZ^+$) de coloração azulada, uma vez que o inserto não foi inserido na MSC dentro do gene $LacZ$. E colônias com células recombinantes (ampicilina resistentes/ $LacZ^-$) de coloração branca com β -galactosidase inativada pela inserto na MSC (BROWN, 1999) (Figura 26).



Figura 26 - Etapa de seleção: Placa com meio LB para visualização colônias brancas e azuis

As colônias características de inserção do DNA recombinante são selecionadas e geram duas alíquotas, uma para estoque em mini-prep com meio LB e glicerol 10%, e outra para amplificação somente de fragmentos clonados, através da PCR utilizando-se de *primers* plasmidiais (Anexo IX) para que gere amplificação somente a partir de fragmentos clonados. Após corrida em gel de agarose 2%, com visualização dos fragmentos amplificados, segue-se para a última etapa da clonagem que é a extração do plasmídeo da célula.

Na etapa de extração, resgata-se o *mini-prep* estocado para purificação e extração do plasmídeo com kit comercial *illustraplasmidPrep Mini Spin GE Life Sciences®* de forma simples e rápida, o processo dura cerca de 20 minutos (Anexo X). A purificação se baseia na lise da membrana celular e desnaturação proteica, com solução de sais caotrópicos e captação do plasmídeo em coluna de sílica, seguida de lavagens para remoção dos contaminantes desnaturados, e eluição do plasmídeo purificado em água DEPC para uso posterior na técnica de sequenciamento (Figura 27) (*GE Life Sciences®* manual).

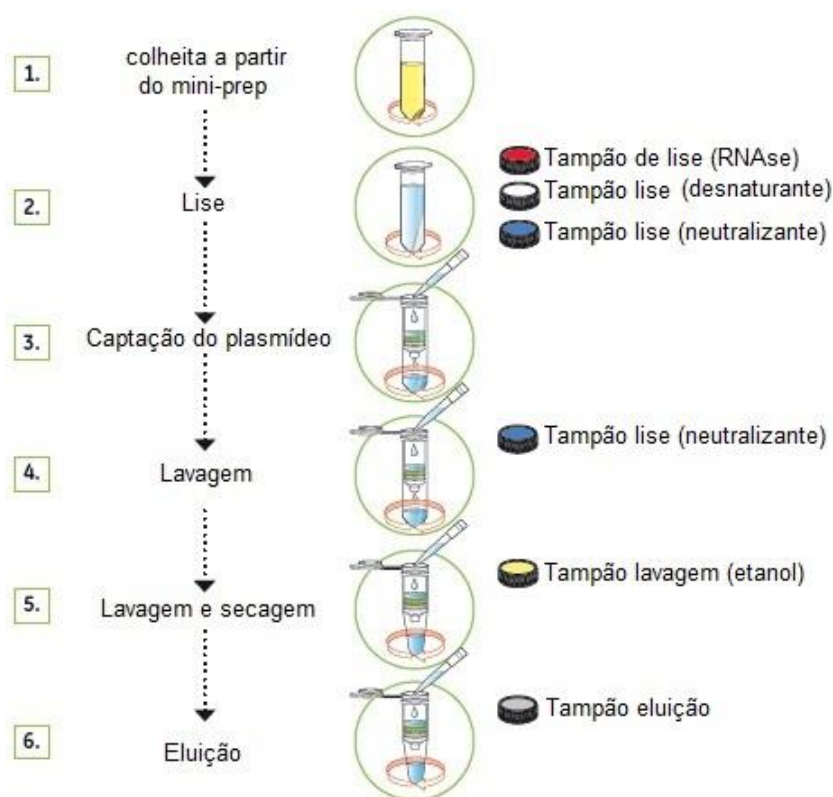


Figura 27 - Reação extração do plasmídeo conforme protocolo fabricante (GE Life Sciences®)

No LABMAS/USP, a técnica de clonagem é utilizada visando amplificação *in vivo* dos fragmentos longos de vírus e com alta variabilidade para posterior sequenciamento dos fragmentos gerados, garantindo um bom eletroferograma sem interferência de picos para análise com confiabilidade dos dados nos processos de bioinformática.

3.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos amplificados na PCR são submetidos à eletroforese em gel de agarose. A corrida se baseia no princípio da polaridade do ácido nucléico que carregado negativamente pelo grupamento do fosfato migra em direção ao pólo positivo da cuba de eletroforese. A amostra é aplicada nas canaletas junto com tampão de amostra, para monitoramento da corrida. O tampão contém corantes (azul de bromofenol; xileno cianol; amarelo G) e reagentes de alta densidade (sacarose, glicerol ou ficol). Para a visualização do fragmento amplificado são necessários agentes

intercalantes de DNA, quem podem ser aplicados diretamente no gel ou após com banhos de imersão. O brometo de etídio é ainda o agente intercalante mais utilizado, porém, devido ao seu potencial mutagênico e a contaminação do ambiente de pesquisa, está gradativamente sendo substituído. No Laboratório de Virologia Animal/UEL utilizava-se o brometo de etídio aplicado diretamente no gel, por isso a necessidade de um setor de eletroforese com uso de materiais restritos. No LABMAS/USP o uso do brometo de etídio era realizado após a corrida com banhos de imersão, visando reduzir a área de contaminação, bem como a gradativa substituição por corantes fluorescentes de menor risco químico como *SyBR Safe®* aplicado diretamente no gel, e o *Gel/Red* utilizado também em banhos de imersão. A visualização é feita em transiluminador, e os fragmentos visualizados sob luz UV emitem fluorescência que possibilitam fotodocumentação (Figura 28) (CORRÊA & POSSIK, 2005).



Figura 28 - Fotodocumentação do gel de agarose 2% após técnica de eletroforese

3.4 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento de nucleotídeos é uma ferramenta útil e versátil aplicável em diferentes áreas da ciência, para estudo dos genomas, diagnóstico molecular; análises filogenéticas; ciência forense; genômica comparada. A técnica se baseia na utilização de desoxinucleotídeos (dNTPs) e didesoxinucleotídeos trifosfato (ddNTPs), que

diferente dos dNTPs não possuem o grupo hidroxila na região 3' do carbono, impedindo o acoplamento sequencial de bases nitrogenadas pela enzima polimerase, cessando então a polimerização (Figura 29). Cada ddNTP é marcado com um conjunto de quatro diferentes fluoróforos radioativos respectivos a cada base nitrogenada, permitindo que os quatro diferentes didesoxinucleotídeos marcados possam ser lidos em uma mesma reação. (SMITH et al., 1986; PROBER et al., 1987; SHENDURE et al., 2008). A reação é sintetizada com uso da enzima Taq DNA Polimerase, e gera sequências de diferentes tamanhos, tendo como molde o DNA de interesse. (SANGER et al., 1970).

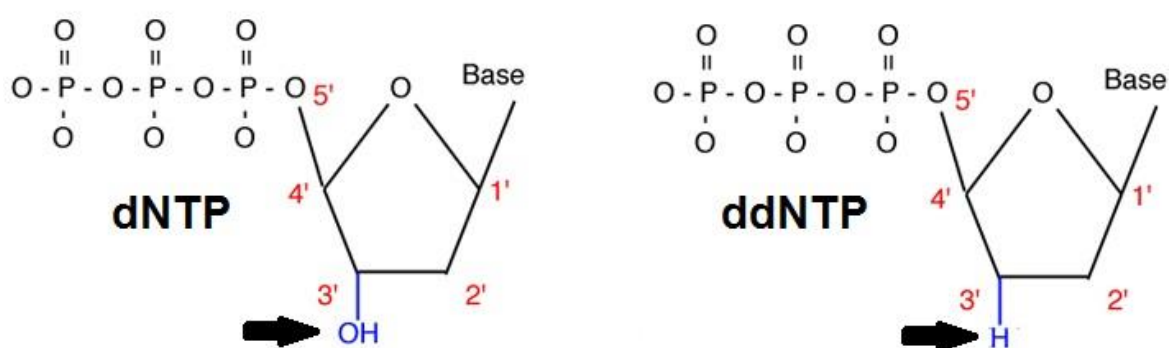


Figura 29 - Conformação química de dNTPS e ddNTPS
Fonte: Prober et al., 1987

Para reação de sequenciamento é necessário partir de uma amostra já amplificada por clonagem ou pela PCR, e realizar uma etapa de purificação, para que resíduos indesejados não interfiram na reação de sequenciamento. Essa etapa de purificação pode ser realizada de diferentes formas. No LABMAS/USP foram realizadas reações de sequenciamento para fragmentos de rotavírus de alpacas, coronavírus respiratório de aves, e rotavírus de aves silvestres, os quais na amplificação e fotodocumentação não se visualizava bandas inespecíficas, por isso na etapa de purificação utiliza-se Kit ExoSap-IT Affimetrix® seguindo recomendações fabricante (Anexo XI). O princípio baseia-se na ação de duas enzimas hidrolíticas a Exonuclease I obtida de *Escherichia coli* que age degradando resíduos de material genético fita simples como *primers* iniciadores e outros DNA fita simples inespecíficos; e a enzima alcalino fosfatase do camarão, que remove dNTPS residuais produtos da PCR. Para que a reação ocorra, as enzimas devem estar em uma temperatura ótima de ação a

37°C, e após elas devem ser inativadas a 80°C para que não prejudiquem a reação de sequenciamento (Figura 30).

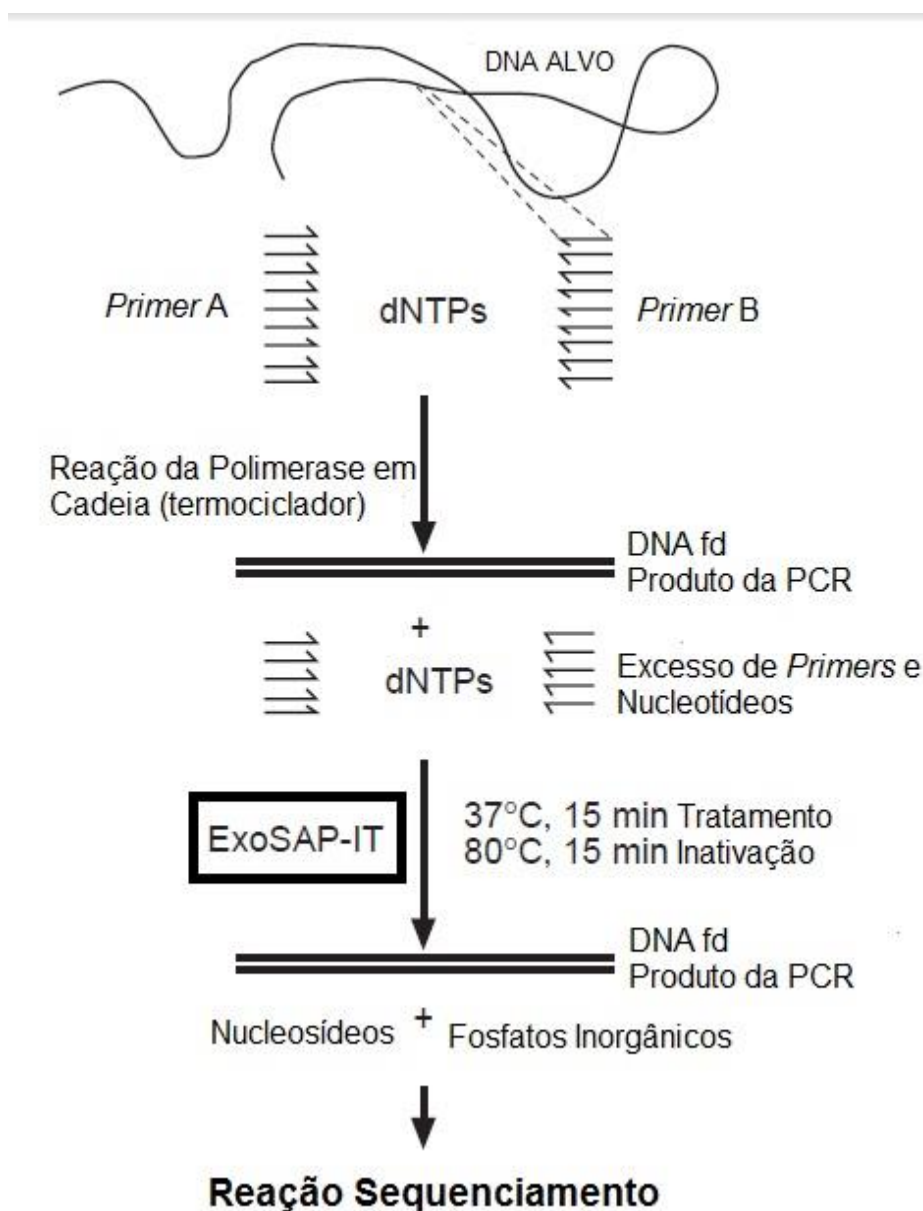


Figura 30 - Reação de Purificação utilizando *Kit ExoSAP-IT Affimetrix®*
Fonte: *Affimetrix®*

A segunda forma de purificação é realizada quando há amplificação de uma ou mais bandas inespecíficas visualizadas no gel. Nesses casos, seleciona-se a banda alvo através de recorte no gel de agarose, e procede com a purificação utilizando *Kit PCR DNA and Gel Band Purification illustra GFX - GE®* (Anexo XII) utilizada no

LABMAS/USP para purificar amostras com bandas extras de coronavírus felino. No Laboratório de Virologia Animal/UEL acompanhei apenas a purificação pelo *Kit Quick Gel ExtractionPurelink - Invitrogen®* (Anexo XIII) a partir de material com bandas inespecíficas para picobirnavírus de bovinos, rotavírus suíno, kobuvírus bovino, e torque-teno vírus suíno, contudo essa forma de purificação era preconizada mesmo no caso de bandas únicas. Ambos os Kits, como outros comercialmente disponíveis, após a etapa de fundir o gel de agarose, utilizam um agente caotrópico, como a guanidina, que remove a água de solvatação para permitir a ligação entre a membrana sílica da coluna e as moléculas de DNA/RNA. Após é adicionado etanol, que por ser uma molécula apolar, forma um precipitado dos DNAs/RNAs por reação hidrofóbica. E por último é adicionado a água ultrapura que refaz a ligação com material genético quebrando a fraca ligação com a sílica obtendo-se portanto o DNA eluído em água.

A quantificação gera dados necessários na solução de preparo na reação de sequenciamento, e é realizada de forma a inferir a concentração aproximada de material que se tem da amostra. No LABMAS/é feita por meio de eletroforese em gel de agarose com marcador *DNA Mass Ladder®* para comparação visual, secundariamente espectrofotômetro ou pelo aparelho *Nanodrop®*. Mas na rotina do laboratório a quantificação é utilizada somente para material amplificado pela técnica de clonagem. No Laboratório de Virologia Animal/UEL utiliza somente a quantificação pelo aparelho *QuBitFluorometer®*. O conhecimento do tamanho do fragmento amplificado, e a concentração de material genético presente na amostra são informações necessárias para o cálculo da reação de sequenciamento, conforme protocolo do fabricante (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração do produto da PCR na reação de sequenciamento conforme protocolo fabricante (BigDyeTerminatorCycleSequencing Kit – AppliedBiosystems®)

Tamanho Produto PCR	Fragmento	Concentração na reação
100 – 200 pb		1-3 ng
200 – 500 pb		3-10 ng
500 – 1000 pb		5-20 ng
1000 – 2000 pb		10-40 ng

> 2000 pb

| 30-50 ng

Fonte: *AppliedBiosystem®*

Em ambos os laboratórios a reação de sequenciamento é realizada com solução mix *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit – AppliedBiosystems®*, para a geração de fragmentos marcados. É necessário a partir de uma mesma amostra obter duas alíquotas, uma para a reação com o *primer* senso, e outra com o *primer* antissenso. Também em ambos os laboratórios utilizava-se adicionalmente o tampão *Safe Money®* para diminuir custo reação além de obter melhores resultados reduzindo o reagente em excesso quando o fragmento alvo é pequeno (< 700pb), reduzindo o volume do Mix *BigDye* (Anexo XIV). A reação é feita em um termociclador, com ciclos de desnaturação, alinhamento e extensão (Anexo XV). Contudo o crescimento ocorre de forma linear, diferente da PCR que tem uma amplificação exponencial. Os fragmentos são formados pela inserção de dNTPs e ddNTPs pela enzima Taq DNA Polimerase, e uma vez que a ligação é feita de forma aleatória, a concentração de ddNTPs deve ser menor que de a DNTps já que a sua inserção na cadeia é menos frequente. Quando ocorre a inserção de um ddNTP a extensão da cadeia é interrompida pois o grupo H no carbono 3' impede ligação de outra base (SHENDURE et al., 2008; PROBER et al., 1987). Após vários ciclos realizados em termociclador, são gerados fragmentos de diferentes tamanhos (Figura 31).

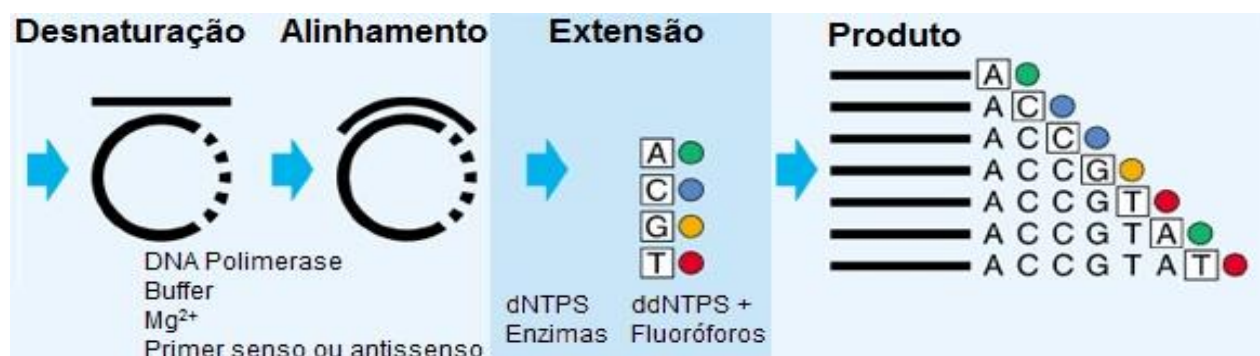


Figura 31 - Reação de Sequenciamento

As amostras após a reação de sequenciamento podem ser precipitadas com *BigDye XTerminator Purification Kit – AppliedBiosystems®* (Anexo XVI) que é utilizado

somente no LABMAS/USP, ou através do protocolo com EDTA/ Etanol/ Formamida (Anexo XVII) utilizado no Laboratório de Virologia Animal/UEL. No LABMAS/USP quando o fragmento alvo para leitura no sequenciador é pequeno (<500pb) utiliza um terceiro protocolo com EDTA/ NaOAc/ Etanol/ Formamida (Anexo XVIII) que reduz a perda de fragmentos pequenos. Essa etapa de precipitação visa a remoção de fluoróforos (*dyes*) não incorporados, nucleotídeos e demais reagentes que interferem na leitura quando submetidos ao sequenciador automático. (AppliedBiosystem^{A,B}®).

Atualmente, no LABMAS/USP, e no Laboratório de Virologia Animal/UEL a leitura da reação de sequenciamento automático é feita através de um aparelho de eletroforese em capilar *ABI3100 AppliedBiosystem®* e *ABI3500 AppliedBiosystem®* respectivamente. Assim como a antiga técnica realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida, a reação de sequenciamento por capilar também necessita de uma constante corrente elétrica para que haja a migração dos fragmentos carregados negativamente para o cátodo. Durante a passagem pelo capilar, um laser excita os fragmentos marcados com fluoróforos, e detecta a faixa de emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda, que são detectadas por um fotomultiplicador. (SHENDURE et al., 2008; DEVOR, 2005) O computador traduz para uma base de dados, chamado de eletroferograma, e gera um arquivo em formato de texto (**fasta*), para leitura e interpretação das sequências obtidas. Essa etapa leva em torno de 24 a 48 horas (Figura 32).

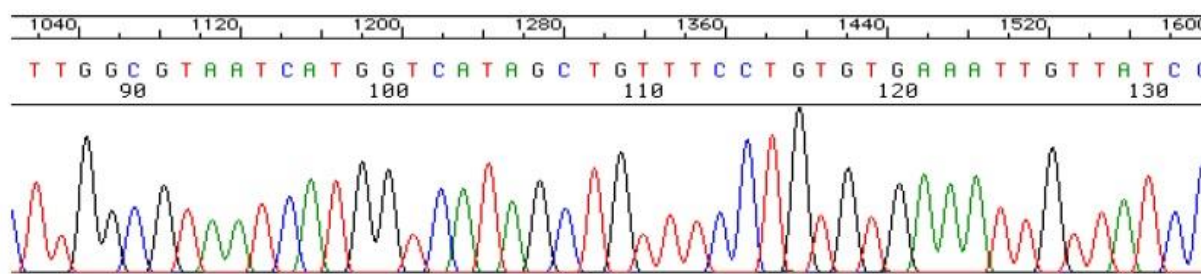


Figura 32 – Eletroferograma

Fonte: programa FinchTV

O arquivo pode ser aberto por diferentes programas de edição e leitura de sequências, no LABMAS/USP e Laboratório de Virologia Animal/UEL os *softwares* mais utilizados para análise de genômica, eram o *FinchTV* utilizado somente no

LABMAS/USP; *Bioedit*; *Mega 5.10*; *PHRED/PHRAP Electropherogram Quality analysis* da Embrapa (web) para posterior alinhamento com dados do *genbank* Pubmed (web).

3.5 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA APLICADAS À ANÁLISE GENÔMICA

A análise de sequências através da bioinformática constitui uma etapa de extrema importância na análise de agentes virais e outros micro-organismos dentro da medicina veterinária e outras áreas da saúde preventiva. A bioinformática é uma ciência que dispõe de diferentes ferramentas para o entendimento do genoma (BARRY, 2013). Permite caracterizar através da análise comparativa da genômica a evolução de determinados vírus, definir proteínas e mutações envolvidas em diversos fatores virais importantes, caracterizar a diversidade viral, gera dados para confrontar com a epidemiologia molecular, bem como facilita a compreensão da dinâmica populacional e a determinação das relações temporal e geográfica dos vírus.

A partir das sequências obtidas é possível avaliar quantitativamente a identidade genômica do vírus pesquisado com outros descritos em uma região ou país (filogeografia), detectar mutações que ocorreram ao longo do tempo (filodinâmica) que permitem inferir os aspectos evolutivos da população viral. Além de possibilitar detecção de cepas mutantes circulantes em rebanhos que divergem das cepas utilizadas nas vacinas, indicando uma possível causa de insucesso nos programas vacinais.

De forma sumária a análise de sequências segue algumas principais etapas (Figura 33). Inicialmente recupera-se o arquivo .ZIP contendo as sequências senso e antissenso do fragmento alvo gerado pelo sequenciador automático ABI *AppliedBiosystem*®. Estas são enviadas ao programa online de análise de qualidade das sequências *PHRED/PHRAP* da *EMBRAPA*® (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) que avalia a confiabilidade de cada base do fragmento, pelo pico gerado no eletroferograma, atribuindo índice de qualidade com valores para cada base. Na análise os valores acima de 20 são considerados dados

confiáveis (TOGAWA et al., 2003). No mesmo programa é possível alinhar as sequências senso e antissenso para gerar um “CONTIG” <cluster sequences using CAP3 for checked reads> que se trata de uma fita consensual das duas fitas, considerando os valores confiáveis de cada base. Na opção <contigslist> copia a sequência em arquivo do *WORD Microsoft®*, junto com os dados gerados na opção <contigis quality list> permitindo avaliar base por base à qualidade correspondente do seu pico através de dados numéricos, sempre considerando um fragmento contínuo com picos acima de 20. Posteriormente edita a sequência removendo as extremidades do fragmento que geralmente apresenta valores abaixo de 20, e salva em formato *.txt* o fragmento editado. No LABMAS/USP esta etapa de avaliação da qualidade do fragmento gerado, e a edição do CONTIG é realizada também através do programa *FinchTV* simultaneamente com o *Bioedit*, a partir da visualização dos picos gerados no eletroferograma, copia-se esses dados, visualmente analisados pela qualidade dos picos para o programa *Bioedit*, alinhando a sequência senso e reverso complemento da antissenso com uma sequência protótipo avaliando nos pontos de divergência qual a qualidade da base a partir da visualização no eletroferograma para gerar então gerar o CONTIG. Esse procedimento torna-se mais dispendioso, além disso gera frequentes dúvidas e reduz a confiabilidade da análise, uma vez que é realizada manualmente, contudo quando avalia-se sequências de alta variabilidade é um bom método mas exige uma maior experiência na análise das sequências por parte do pesquisador.

Utilizando a ferramenta online *Basic Local Alignment Search Tool - BLAST®* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), escolhe a opção <nucleotide blast> e anexa o fragmento editado salvo no formato *.txt*, para verificar através da similaridade da sequência quais as sequências depositadas disponíveis são similares, e o quanto são similares ao fragmento anexado. Faz-se o download das sequências homólogas para comparar o fragmento do gene da proteína estudada; download de sequências de proteínas de outras estirpes virais pertencentes ao mesmo gênero para ser utilizada como comparativo, e download de sequências distantes filogeneticamente pertencentes a uma mesma família viral, para utilizar como “out group” na construção da árvore filogenética. Salva todas as sequências para alinhamento em um mesmo arquivo *.txt* identificadas com código de acesso do *genbank*, cada uma com símbolo “>” necessário

para leitura dos dados nos programas de alinhamento. No programa *Mega 5.10*, faz o alinhamento <*Clustal W*> das sequências, e depois corta as extremidades que não se alinham, salvar em novo arquivo de *.txt/.fasta/.mega* com informação editadas. Abre as sequências no programa *Bioedit* e realiza a matriz de identidade das sequências, que traduz na forma numérica o quão semelhantes são as amostras quando comparadas entre si. A matriz de distância, pode ser gerada no programa *MEGA 5.10* e é mais um dado que pode ser acrescentado na análise, matematicamente determina o quão distante estão as amostras quando comparadas entre si. A árvore filogenética é montada por repetições <*bootstraps*> que conforme o número de repetições aumenta a confiabilidade da árvore, em trabalhos publicados, a *bootstrap* acima de 1000 gera dados de maior confiabilidade, diferentes métodos fenéticos relacionados à similaridade das sequências para nortear como essas repetições irão acontecer, são eles: métodos baseados em distância; método princípio evolução mínima; métodos cladísticos e métodos probabilísticos. Somado à isso, a árvore é também construída seguindo diferentes inferências estatísticas de substituições de bases nas repetições: *Junkes-Cantor*; *Felsenstein 81*; *Kimura-2P*; *Distância P*; *Kimura-3-parâmetros*; *Hasegawa-Kishino-Yano*; *Tajima e Nei*; *Tamura-3P*; *Felsenstein 84*; *Tamura-Nei*; *General Time Reversible*. Cada inferência estatística é representativa, dependendo dos trabalhos na área em que se pretende comparar dados, então a escolha se baseia nos trabalhos publicados utilizados como referência no estudo da filogenia do gene viral em questão, mas também pode ser escolhida através de sugestões pelo programa *J Model Test* ou pela função *Model test* inserida no programa *MEGA 5.10*, que após carregar os dados das sequências para análise, sugere os possíveis métodos que podem ser utilizados (BARRY, 2013).

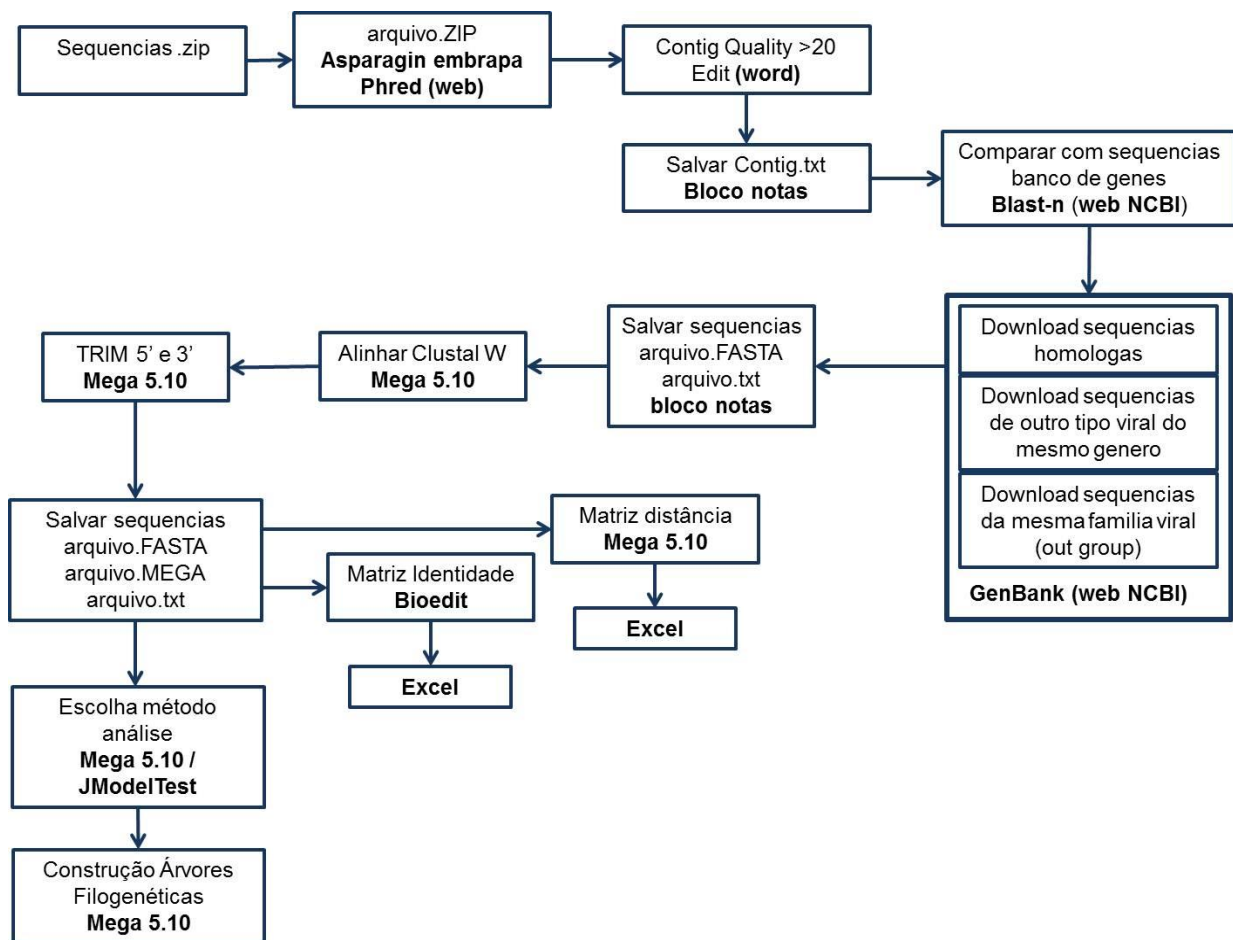


Figura 33 - Fluxograma das etapas de edição das seqüências para filogenia

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso das tecnologias de biologia molecular na medicina veterinária preventiva tem se tornado cada vez mais imprescindível, uma vez que as pesquisas não estão só voltadas para o diagnóstico da doença, mas também para a base molecular da história natural da doença reconhecendo mutações nas regiões de genes que codificam proteínas relacionadas aos fatores de virulência e patogenicidade.

De maneira totalmente flexível, a biologia molecular é uma ferramenta eficaz para explorar, expandir e sustentar os conhecimentos frente aos vírus de interesse em medicina veterinária. Permitindo reconhecer os mecanismos de virulência e patogenicidade de determinado agente viral, e caracterizar epidemiologicamente a relação filogenética das interações dos vírus com o ambiente e seus hospedeiros, estruturando de forma contínua a biologia evolutiva. Para tanto, é de extrema importância que o médico veterinário esteja preparado e tenha conhecimento da aplicabilidade e da importância dessas técnicas no diagnóstico e nas possíveis mutações dos vírus, bem como as consequências que eles podem gerar em setores de produção animal e saúde pública.

Em ambos locais de estágio, foi possível ter esse maior contato diário com a rotina laboratorial frente às técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico e pesquisa de agentes virais, aprofundando e consolidando conhecimentos teóricos, e habilidades práticas. Além disso, a vivência com diferentes linhas de pesquisa inseridas na virologia veterinária que se utilizam da biologia molecular, só vem a reforçar o potencial de aplicação e interação entre a medicina veterinária e a biologia molecular.

Durante o período de estágio no LABMAS/USP, o uso de diferentes ferramentas para práticas já conhecidas previamente, permitiu reconhecer etapas que permitem uma maior manipulação para melhoramento da técnica, como o uso de diferentes *kits* de extração, reagentes e protocolos de uso na técnica de PCR e eletroforese. Além disso, o aprendizado teórico concomitante com o aprendizado prático das técnicas de sequenciamento, clonagem e posteriormente a análise filogenética a partir de ferramentas de bioinformática agregaram grandiosamente à minha formação profissional. A interação com diferentes pesquisadores e profissionais ligados ao

Departamento de Medicina Veterinária e Saúde, bem como a participação das aulas de graduação da disciplina de gerenciamento em saúde animal e saúde pública, e as aulas para alunos intercambistas de práticas de biologia molecular aplicadas à medicina veterinária, ambas ministradas pelo Prof. Dr. Fábio Gregori também foram positivas experiências que enriqueceram o período de estágio curricular supervisionado.

No Laboratório de Virologia Animal/UEL, parte das técnicas e protocolos utilizados já era de conhecimento durante o período de iniciação científica na graduação, e a maior parte do tempo passei exercendo funções já praticadas. Contudo o acompanhamento das técnicas de sequenciamento, clonagem e análise filogenética comparada ao estágio anterior acrescentaram de maneira a estabelecer um paralelo dos pontos positivos e negativos de cada protocolo utilizado, o que permite futuramente nortear as escolhas e ferramentas a serem utilizadas baseadas em conhecimentos teóricos e práticos das técnicas.

Além das questões supracitadas, aspectos que devem ser avaliados quando se trabalha em ambientes de laboratório, onde estão presentes riscos químicos, físicos e biológicos são as práticas de biossegurança sob o aspecto funcional e integrado. No LABMAS/USP, a exigência ao cumprimento de normas de biossegurança é pré-estabelecido no momento em que o aluno utiliza o espaço físico do laboratório, e durante o período de estágio foi perceptível que essa exigência se estende a todos os usuários e frequentadores do LABMAS/USP. Além disso durante o período de estágio estava sendo elaborado pelas técnicas um mapa de risco de todos os setores do LABMAS/USP que seria posteriormente afixado nos locais de forma informativa. Comparativamente, essas exigências e aspectos que visam a saúde de todos os pesquisadores e demais frequentadores que estão em contato contínuo com materiais de risco, não foi observada na vivência do Laboratório de Virologia Animal/UEL, em parte por desconhecimento ou por negligência dos perigos presentes na rotina do laboratório.

5. REFERÊNCIAS

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, p.521-526, 2006.

APPLIED BIOSYSTEMS^A®. *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* Manual. Disponível em: < http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_081527.pdf > Acesso: 10 de novembro de 2013.

APPLIED BIOSYSTEMS^B®. *BigDyeX Terminator Purification Kit* Manual. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042772.pdf> Acesso: 10 de novembro de 2013.

ARRUDA, R.G. **Temperatura de melting um estudo comparativo**. 2010. Disponível em: <<http://www.facom.ufms.br/>> Acesso: 10 de novembro de 2013

BARROS, I. C. et al. Recomendações referentes à segurança nos laboratórios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, n. 101, 2003.

BARRY, G.H. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. **Mol. Biol. Evol.** 2013. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/>> Acesso: 25 de novembro de 2013.

BROWN, T.A. **Genética: Um enfoque molecular**. 3º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999. Cap 20 – Clonagem de genes. p. 261-276

CARUSO, C.S. Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de *Xylella fastidiosa*. **Teses FAPESP**. 2007. Disponível em: <http://www.agencia.fapesp.br/arquivos/tese_celia_caruso.pdf> Acesso: 20 de novembro de 2013

CORRÊA, E. M.; POSSIK, P.A. **Biologia Molecular – Técnicas Moleculares: Análise de DNA por Eletroforese**. Academia de Ciência e Tecnologia. 2005. Disponível em: <www.ciencianews.com.br/index.php/ciencia/biologia-molecular/biologia-molecular-tecnicas-moleculares> Acesso: 10 de novembro de 2013.

DEVOR, E.J. **IDT tutorial: DNA Sequencing**. Integrated DNA Technologies. 2005. Disponível em: <http://wiki.bio.dtu.dk/teaching/images/3/3e/DNA_SequencingTutorial.pdf> Acesso: 25 de agosto de 2013.

GE LIFE SCIENCES®.Manual Kit illustraplasmidPrep Mini Spin. Disponível em: <https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28951561AF_20110831095457.pdf> Acesso: 30 de agosto de 2013

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à genética**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. Capítulo 14 – Tecnologia do DNA recombinante. P. 399-453

INVITROGEN®.Manual SuperScript™ II Reverse Transcriptase. Disponível em: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/superscriptII_pps.pdf> Acesso: 20 de novembro de 2013

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia Genética e Biotecnologia**. 2ed – Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 167-197.

McHERSON, M.J.; QUIRKE, P; TAYLOR, G.R. **PCR A Pratical Approach**. v. 1 Oxford, USA: IRL Press Oxford University. 1991.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Série Biologia molecular - Atualização: Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**. v.2 n.2 p.139-142. 2004

PIERCE, B.A. **Genética um enfoque conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011. p. 509-516

PROBER, J.M.; TRAINOR, J.L.; DAM, R.J.; HOBBS, F.W.; ROBERTSON, C.W.; ZAGURSKY, R.J.; COCUZZA, A.J.; JENSEN, M.A.; BAUMEISTER, J. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. **Science** v. 238 p.336-341. 1987

PROMEGA^A®.GoTaq® Green Master Mix manual. Disponível em: <<http://www.promega.com.br/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/G/GoTaq%20Green%20Master%20Mix%20Protocol.pdf>> Acesso: 20 de novembro de 2013

PROMEGA^B®.pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems technical manual. Disponível em: <<http://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/?origUrl=http%3a%2f%2fwww.promega.com%2fresources%2fprotocols%2ftechnical-manuals%2f0%2fpgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol%2f>> Acesso: 16 de agosto de 2013.

SANGER F.;NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. **ProcNatI AcadSci USA** v.74.n.12. p.5463-5467. 1977

SHENDURE, J.A.; PORRECA, G.J.; CHURCH G.M. Overview of DNA Sequencing Strategies. **Current Protocols in Molecular Biology**.n.7.1. p.1-11. janeiro. 2008

SILVER, J. **Inverse polymerase chain reaction** p.137-145. In: A Practical Approach. Volume 1 IRL Press Oxford University Press: Oxford, USA. 1991.

SMITH, LM, JZ SANDERS, J.Z.; RJ KAISER, R.J.; HUGHES, P.; DODD, C.; CONNELL, C.R.; HEINER, C.; KENT, S.B.H.; HOOD, H.E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature** 321: p674-679. 1986

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genética. Análise Genética Molecular – Técnicas de Genética Molecular**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997 p. 450-473.

TAYLOR, G. R.; **Polymerase Chain reaction: basic principles and automation** In: A Practical Approach. Volume 1 IRL Press Oxford University Press: Oxford, USA. p. 1-13. 1991

THERMO SCIENTIFIC®. Manual Kit InsTAclone PTZ57. Disponível em: <http://www.thermoscientificbio.com/molecular-cloning/instaclone-pcr-cloning-kit/> Acesso: 16 de agosto de 2013.

TOGAWA, R.C.; BRIGIDO, M.M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st. International Conference on Bioinformatics and Computational Biology – IcoBiCoBi. 2003.
Disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/ribeirao_preto_poster.pdf>
Acesso: 25 de novembro de 2013

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo : Atheneu Editora, 1999. 334 p.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GRANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R.; **Biologia Molecular do gene**. 5ed – Porto Alegre: Artmed, 2006. Cap 20 Técnicas de biologia molecular. p. 648 - 665

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. (organizadores). **Biologia Molecular Básica**. 3º ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. Capítulo 16 – Técnicas de Biologia Molecular. P. 379 -413

ANEXOS

ANEXO I

Protocolo Extração Tecidos – *TRIzol® Plus RNA Purification Kit* – *Life Technologies*

- 500 µl macerado órgão/ C+ 500 µl
- Adicionar 500µl água DEPC (1:1)
- 1. Descongelar 57°C/ 15 minutos
- 2. Homogeneizar vigorosamente
- 3. Congelar -80°C/ 15 segundos (nitrogênio líquido)
- 4. Repetir etapas 1 – 3 (3X)
- 5. Centrifugar 5.000 g./ 4°C/ 15 minutos
- 6. Recolher 250 µl sobrenadante em outro microtubo / C- 250 µl água DEPC
- 7. 750 µl Trizol
- 8. Homogeneizar vigorosamente
- 9. Incubar temperatura ambiente/ 5 minutos
- 10. 200 µl Clorofórmio
- 11. Homogeneizar vigorosamente
- 12. Incubar temperatura ambiente (DNA) / Incubar 4°C (RNA) / 10 min.
- 13. Centrifugar 12.000 g./ 4°C/ 15 minutos
- 14. Recolher 500 µl sobrenadante em outro microtubo
- 15. 500 µl Propanol
- 16. Homogeneizar manualmente / 15 segundos
- 17. Incubar temperatura ambiente (DNA) / Incubar 4°C (RNA)/ 10 minutos
- 18. Centrifugar 12.000 g. / 4°C / 15 minutos
- 19. Desprezar sobrenadante
- 20. 950 µl etanol 75%
- 21. Centrifugar 12.000 g. / 4°C / 10 minutos
- 22. Desprezar sobrenadante/ secar por capilaridade
- 23. Secar o pellet em termobloco/ 57°C / 5 – 10 minutos (tubo aberto)
- 24. 20 µl água DEPC
- 25. Termobloco / 57°C / 10 minutos (tubo fechado)

26. Estocar - 20°C

ANEXO II

Protocolo Extração Fezes – *TRIzol® Plus RNA Purification Kit* – *Life Technologies*

- 250 µl macerado órgão / C+ 250 µl / C- 250 µl (água Depec)

01. 750 µl Trizol

02. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos

03. Incubar temperatura ambiente/ 5 minutos

04. 250 µl Clorofórmio

05. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos

06. Incubar temperatura ambiente (DNA) / Incubar 4°C (RNA) / 10 minutos

07. Centrifugar 12.000 g./ 4°C/ 15 minutos

09. Recolher 500 µl sobrenadante em outro microtubo

10. 500 µl Propanol

11. Homogeneizar vigorosamente / 15 segundos

12. Centrifugar 12.000 g. / 4°C / 15 minutos

13. Desprezar sobrenadante/ secar por capilaridade

14. 950 µl etanol 75%

15. Centrifugar 12.000 g. / 4°C / 15 minutos

16. Desprezar sobrenadante

17. Secar o pellet em termobloco/ 57°C / 5 – 10 minutos (tubo aberto)

18. 20 µl água DEPC

19. Termobloco / 56°C / 20 minutos (tubo fechado)

20. Homogeneizar vigorosamente / 15 segundos

21. Centrifugar 12.000 g. / 4°C / 1 minuto

22. Estocar - 20°C

Anexo III

Protocolo Extração Tecidos – *Kit Purelink Viral DNA/RNA/Minikit - Invitrogen®*.

- 100 µl macerado órgão c/ RNA later – *Life Technologies®*

1. Centrifugar 5.000 g. / 5 – 10 minutos
2. Descartar sobrenadante
3. 200 µl PBS (refrigerado)
4. Repetir etapas 1-3
5. 25 µl Proteinase K (Kc 20mg/ µl) refrigerada
6. 200 µl Buffer Lise (L22)
7. Homogeneizar vigorosamente / 15 segundos
8. Incubar 56°C/ 15 minutos
9. Centrifugar 7.000 g. / 1 minuto
10. 250 µl etanol 96-100%
11. Homogeneizar vigorosamente / 15 segundos
12. Incubar Temperatura ambiente/5 minutos
13. Centrifugar 7.000 g./ 1 minuto
14. Transferir ≤ 700 µl Líquido do lisado para coluna c/ tubo coletor
15. Centrifugar 7.000 g./ 1 minuto
16. Descarta tubo coletor
17. Acopla novo tubo coletor
28. 500 µl Wash Buffer
29. Centrifugar 7.000 g./ 1 minuto
30. Descarta líquido tubo coletor (mas mantem o tubo coletor)
31. 500 µl Wash Buffer
32. Centrifugar 7.000 g./ 1 minuto
33. Descarta tubo coletor
34. Acopla coluna Recovery Tube
35. 50 µl água RNA/DNA Free

36. Incubar Temperatura Ambiente / 1 minuto
37. Centrifugar alta rotação/ 1 minuto
38. Recolhe em microtubo
39. Armazenar DNA -20°C / RNA -80°C

Anexo IV

Extração Fezes: associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/ isotiocianato de guanidina (Alfieri, 2006)

1. 500 µl da suspensão fecal/C+ 500 µL suspensão fecal
2. 50 µl de SDS a 10%
3. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
4. Banho-maria 56°C / 20 minutos
5. Adicionar 500 µl de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (*2 Fases)
6. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
7. Banho-maria a 56°C/ 15 minutos
8. Centrifugar a 13.000 g. / 10 minutos
9. Recolher sobrenadante em outro microtubo
10. 25 µl de sílica hidratada (geladeira)
11. 500 µl de solução L6 (geladeira)
12. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
13. Agitar temperatura ambiente/ ≥30 minutos
14. Centrifugar a 13.000 g./1 minuto
15. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
16. Adicionar 500 µl de solução L2 (geladeira)
17. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
18. Centrifugar a 13.000 g./ 1minuto
19. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
20. Adicionar 500 µl de solução L2
21. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
22. Centrifugar 13.000 g. / 1minuto
23. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
24. Adicionar 1 ml de etanol 70% (freezer)
25. Homogeneizar em vórtex

26. Centrifugar 13.000 g./ 1 minuto
27. Desprezar sobrenadante
28. Adicionar 1 ml de etanol 70%
29. Homogeneizar em vórtex
30. Centrifugar a 13.000 g/ 1 minuto
31. Desprezar sobrenadante
32. Adicionar 1 ml de acetona PA (freezer)
33. Homogeneizar em vórtex
34. Centrifugar a 13.000 g./ 1 minuto
35. Desprezar sobrenadante
36. Incubar 56°C/ 15 minutos (tubo aberto)
37. Adicionar 50 µl de água MilliQautoclavada
38. Homogeneizar em vórtex
39. Incubar 56°C/15 minutos (tubo fechado)
40. Homogeneizar em vórtex
41. Centrifugar a 13.000 g./ 4 minutos
42. Recolher sobrenadante em microtubo de 500 µl
43. Estocar a -20°C

Anexo V

Extração Tecido: Associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/ isotiocianato de guanidina (Alfieri, 2006)

1. 250 µl de Macerado
2. 1ml PBS
3. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
4. Centrifugar 1000 g./ 5 minutos
5. Recolher 500 µl sobrenadante
6. 50 µl SDS 10%
7. 10 µl Proteinase K
8. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
9. Banho-maria a 56°C/ 30 minutos
10. Centrifugar 13.000 g/ 1 minuto
11. 500 µl de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (*2 Fases)
12. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
13. Banho-maria a 56°C/ 15 minutos
14. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
15. Centrifugar 13.000 g. / 10 minutos
16. Recolher sobrenadante em outro microtubo
17. 25 µl de sílica hidratada (geladeira)
18. 500 µl de solução L6 (geladeira)
19. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
20. Agitar temperatura ambiente/ ≥30 minutos
21. Centrifugar a 13.000 g./1 minuto
22. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
23. Adicionar 500 µl de solução L2 (geladeira)
24. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
25. Centrifugar a 13.000 g./ 1 minuto
26. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M

27. Adicionar 500 µl de solução L2
28. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
29. Centrifugar 13.000 g. / 1 minuto
30. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
31. Adicionar 1 ml de etanol 70% (freezer)
32. Homogeneizar em vórtex
33. Centrifugar 13.000 g./ 1 minuto
34. Desprezar sobrenadante
35. Adicionar 1 ml de etanol 70%
36. Homogeneizar em vórtex
37. Centrifugar a 13.000 g/ 1 minuto
38. Desprezar sobrenadante
39. Adicionar 1 ml de acetona PA (freezer)
40. Homogeneizar em vórtex
41. Centrifugar a 13.000 g./ 1 minuto
42. Desprezar sobrenadante
43. Incubar 56°C/ 15 minutos (tubo aberto)
44. Adicionar 50 µl de água MilliQ autoclavada
45. Homogeneizar em vórtex
46. Incubar 56°C/15 minutos (tubo fechado)
47. Homogeneizar em vórtex
48. Centrifugar a 13.000 g./ 4 minutos
49. Recolher sobrenadante em microtubo de 500 µl
50. Estocar a -20°C

Anexo VI

Clonagem etapa: Ligação Kit *Plasmídeo pGEM-T Promega®*

Mix reação ligação	Volume
Vetor pTZ57 (0,17pmol)	1 µl
Tampão ligação 5x	2 µl
Produto PCR	2 µl *Variável conforme tamanho fragmento/ quantificação
Água DEPC	3 µl
T4 DNA Ligase 3U/ µl	3 µl
Volume Total	10 µl

* Cálculo utilizando <www.promega.com/biomath>

$$\frac{\text{Quantidade de DNA em 1 } \mu\text{l} \times \text{tamanho fragmento}}{\text{tamanho plasmídeo}} \times \frac{3}{1} = \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

- Incubar overnight / 4°C

Anexo VII

Clonagem etapa: Preparo estoque células competentes

Dia 01

1. Resgatar células mãe estocadas em glicerol/ freezer -80°C
2. Descongelar em banho gelo
3. Inocular em 3,5 ml meio líquido SOB sem $MgCl_2$ e sem Antibiótico.
4. Incubar 37°C/ 220 RPM/ overnight.

Dia 02

5. Passar 2 ml da pré-cultura para 50 ml meio líquido SOB (pré aquecido 37°C)
6. Incubar 37°C/ 220 – 250 RPM até atingir D.O. (600nm)
 - * No espectrofotômetro: a cada 30 minutos o número de células duplica.
- Branco = Meio SOB sem adição bactérias
7. Atingida D.O. acondicionar frasco banho gelo
8. Adicionar 1 ml $MgCl_2$ (1M) gelado/ estéril
9. Incubar em banho gelo/ 15min – 1 hora
10. Centrifugar 4000 RPM/ 4°C/ 15 minutos
11. Descartar sobrenadante e retirar excesso meio c/ pipeta
12. Ressuspender gentilmente cada pellet com 10 ml $CaCl_2$ (filtrado e gelado) *células estão frágeis.
13. Incubar banho gelo / 15 minutos * Não mexer
14. Centrifugar 4000 RPM/ 4°C/ 15 minutos
15. Descartar sobrenadante
16. Ressuspender gentilmente pellet com 1 ml $CaCl_2$ (filtrado e gelado) 10% glicerol
17. Distribuir em alíquotas de 50 µl e congelar em nitrogênio líquido imediatamente
18. Armazena estoque freezer -80°C

Anexo VIII

Clonagem etapa: Inserção/ Transformação

1. 100µl bactéria competente, descongelar na hora (banho gelo 15 min)
 2. Aplicar 10µl reação de ligação na bactéria
 3. Incubar 20-30min (banho gelo)
 4. Choque térmico 42°C/ 1-2min (termociclador)
 5. Banho gelo/2min (IMEDIATO)
 6. adicionar 900µl meio SOC
 7. Incubar 37°C/ 1h30min/ rotação 150 RPM
 8. Preparar placas (meio LB + ampicilina 10%) com IPTG 20µl e XGal 10µl (Incubar 37°C/20min)
 9. Plaquear 100µl no meio LB (pré-aquecido)
 10. Incubar 37°C/ overnight/ rotação 150 RPM
- *Máximo 15h para etapa seleção

Anexo IX

Clonagem etapa: Seleção

1. Selecionar colônias brancas
* Com palito de madeira autoclavados.
2. PCR clones M13R – M13F (primers do plasmídeo)
3. Incubar (meio LB 3ml) 37°C/ overnight/ rotação 150 RPM
4. Congelar em glicerol 10%

Etapa – PCR primers genes plasmidiais

Mix PCR	Volume
GoTaq®	6,25 µl
Primer fw	0,625 µl
Primer rev	0,625 µl
Água DEPC	3,75 µl
Volume Total	12 µl

Anexo X

Clonagem etapa: Extração Plasmídeo *Kit Illustra Plasmid Prep Mini Spin Kit – GE®*

1. Transferir 1,5 ml do mini-prep para microtubo
2. Centrifugar 16000 g./ 1 minuto
3. Descartar sobrenadante
4. Centrifugar 16000 g./ 1 minuto
5. Remover excesso sobrenadante com pipeta
6. Adicionar 175 µl tampão lise (tipo 7)
7. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
8. Adicionar 175 µl tampão lise (tipo 8)
9. Homogeneizar por inversão (5x)
10. Adicionar 350 µl tampão lise (tipo 9)
11. Homogeneizar gentilmente por inversão até desfazer precipitado
12. Centrifugar 16000 g./ 5 minutos
13. Transferir sobrenadante \approx 700 µl para coluna acoplada em tubo coletor
14. Centrifugar 16000 g./ 1 minuto
15. Desprezar liquido tubo coletor
16. Adicionar 400 µl tampão lise (tipo 9)
17. Centrifugar 16000 g./ 1 minuto
18. Desprezar liquido tubo coletor
19. Adicionar 400 µl tampão lavagem (tipo 1)
20. Centrifugar 16000 g./ 1 minuto
21. Desprezar liquido tubo coletor
22. Centrifugar 16000 g./ 1 minuto
23. Desprezar tubo coletor e acoplar novo tubo coletor
24. Adicionar 100 µl tampão eluição (tipo 4)
25. Incubar temperatura ambiente/ 1 minuto
26. Centrifugar 16000 g./ 1 minuto
27. Recolher em microtubo
28. Armazenar -20°C

Anexo XI

Sequenciamento etapa: *Purificação Kit Exosap-IT Affimetrix®*

1. 5 µl amostra em duplicata
2. 2 µl Enzima ExoSAP
3. Incubar 37°C/ 15 min
4. Inativação enzima 80°C/ 15 min

Anexo XII

Sequenciamento etapa: Purificação *Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* GE®

1. 500 µl banda recortada gel agarose
 2. 500 µl tampão de captura 3
 3. Incubar 60°C/ 15 – 30 min * Misturar por inversão a cada 3 min
 4. Transferir 800 µl para coluna e acoplar tubo coletor
 5. Incubar temperatura ambiente/ 1 min
 6. Centrifugar 16000 x g / 30s
- Repetir etapas 4 – 6
7. Descartar tubo coletor
 8. Acoplar novo tubo coletor à coluna
 9. 500 µl tampão de lavagem 1
 10. Centrifugar 16000 x g / 30 s
 11. Descartar tubo coletor
 12. Acoplar novo tubo coletor à coluna
 13. 10 – 50 µl tampão eluição 4 ou 6
 14. Incubar temperatura ambiente/ 1 min
 15. Centrifugar 16000 x g / 1 min
 16. Descartar coluna
 17. Recolher amostra do tubo coletor
 18. Armazenar DNA purificado- 20°C

Anexo XIII

Sequenciamento etapa: Purificação *Kit Quick Gel Extraction Purelink - Invitrogen®*

1. Recorta banda gel e armazena microtubo 1,5 µl
2. Pesa microtubos
3. Adicionar tampão de solubilização (L3)(1gel : 3 L3)
4. Incubar 50°C/ 15 minutos (Inverter a cada 3 minutos)
5. Centrifugar 14.000 RPM/ 2 minutos
6. Adicionar ≤ 300 µl do sobrenadante na coluna com microtubo descarte acoplado
 - * Se volume sobrenadante > 300 µl fazer 2x
7. Centrifugar 14.000 RPM/ 3 minutos
8. Descarta liquido microtubo descarte
9. 500 µl tampão lavagem W1
10. Centrifugar 14.000 RPM/ 2 minutos
11. Descarta liquido microtubo descarte
12. Centrifugar 14.000 RPM/ 1 minuto
13. Descarta microtubo descarte
14. Acopla microtubo recolher amostra *Identificado
15. 15 µl tampão eluição (E5)
16. Incubar temperatura ambiente/ 1 minuto
17. Centrifugar 14.000 RPM/ 2 minutos
18. 15 µl tampão eluição (E5)
19. Incubar temperatura ambiente/ 1 minuto
20. Centrifugar 14.000 RPM/ 2 minutos
21. Recolher em 2 alíquotas por amostra
 - 2 µl Quantificação
 - 25 µl Reação Sequenciamento

Anexo XIV

Sequenciamento etapa: Mix reação *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* – *Applied Biosystems®*

Reagente	Volume
Mix Big Dye	2 µl
Tampão	1,5 µl
Agua DEPC	0,5 µl
Total	4 µl
+ Primer senso	1 µl
+ Material Purificado	5 µl
Total	10 µl

Reagente	Volume
Mix Big Dye	2 µl
Tampão	1,5 µl
Agua DEPC	0,5 µl
Total	4 µl
+ Primer antissenso	1 µl
+ Material Purificado	5 µl
Total	10 µl

Anexo XV

Sequenciamento etapa: Programa Sequenciamento (Termociclador) *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit – Applied Biosystems®*

1.	96°C/ 1 min
2.	96°C/ 10 seg
3.	50°C/ 5 seg
4.	60°C/ 4 seg
5.	Repetir 25x etapas 2 – 4
6.	4°C / forever

Anexo XVI

Sequenciamento etapa: Mix Reação Precipitação *BigDye XTerminator Purification Kit – Applied Biosystems®*

1. 45 µl buffer SAM
2. 10 µl enzima *XTerminator*
3. Manter em agitação 1200 rpm./ 30 min
4. Pronto para aplicar Sequenciador automático *ABI AppliedBiosystem®*

Anexo XVII

Sequenciamento etapa: Precipitação EDTA/ Etanol/ Formamida

1. 10 µl reação
2. 2,5 µl EDTA (125 mM pH 8,0)
3. 30 µl etanol 100% (gelado)
4. Selar Placa
5. Homogeneizar manualmente inversão (30x)
6. Centrifugar 2500 g. /1 min
7. Incubar temperatura ambiente/ escuro/ 10 min * Por causa dos fluoróforos Big Dye
5. Centrifugar 2720 g./ 20°C / 30 min
6. Remover selante
7. Desprezar conteúdo por inversão
7. Centrifugar invertido 3000 g./ 1 minuto*para remover todo excesso
8. 100 µl etanol 70%
9. Centrifugar 3000 x g/ 1 min
10. Centrifugar invertido 300 g./ 1 minuto
11. Evaporar placa/ 5 – 10 minutos
12. 10 µl formamida HiDi
13. Homogeneizar vigorosamente/ 15 segundos
14. Centrifugar 3000 g. / 1 min
14. 94°C/ 5 minutos (termociclador)
15. Banho gelo/ 1 minuto (cooler)
16. Pronto para leitura sequenciamento automático ABI Applied Biosystem®

Anexo XVIII

Sequenciamento etapa: Precipitação Fragmentos pequenos com EDTA/ NaOAc/ Etanol

* Acetado de sódio (NaOAc) previne perda fragmentos pequenos, mas não remove todos os dyes não incorporados.

1. 10 µl reação sequenciamento
2. 1 µl EDTA 125 mM + 1 µl NaOAc 3M (Mix)
3. 25 µl etanol 100% (gelado)
4. Incubar temperatura ambiente/ escuro/ 15 minutos * Por causa dos fluoróforos *Big Dye*
5. Centrifugar 2500 g. / 15°C / 30 minutos
6. Inverter tubo imediatamente
7. Spin invertido (para remover todo excesso)
8. 35 µl etanol 70%
9. Centrifugar 2500 g./ 15°C/ 15 minutos
10. Inverter tubo imediatamente
11. Banho seco 94°C (termociclador)/ 5 minutos
12. Spin invertido baixa rotação
- >Permite armazenar - 20°C
13. 9 µl formamidaHiDi
14. 94°C/ 5 minutos (termociclador)
15. 4°C/ 2 minutos (termociclador)
16. Pronto para leitura sequenciamento automático ABI Applied Biosystem®